ACTA MICROBIOLOGICA

ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE

ADIUVANTIBUS

D. FEHÉR, J. HORVÁTH, G. IVÁNOVICS, S. KOTLÁN, R. MANNINGER, A. PELC, J. SZIRMAI

REDIGIT

A. HAVAS

TOMUS I FASCICULI 1—3

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA

BUDAPEST, 1954

ACTA MICROBIOLOGICA

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA MIKROBIOLÓGIAI KÖZLEMÉNYEI

KIADÓHIVATAL: BUDAPEST, V., ALKOTMÁNY-UTCA 21.

Az Acta Microbiologica orosz, francia, angol és német nyelven közöl értekezéseket a mikrobiológia tárgyköréből.

Az Acta Microbiologica változó terjedelmű füzetekben jelenik meg. Több füzet alkot egy kötetet.

A közlésre szánt kéziratok, géppel írva, a következő címre küldendők:

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

Ugyanerre a címre küldendő minden szerkesztőségi levelezés.

Az Acta Microbiologica előfizetési ára kötetenként belföldre 80, külföldre 110 Ft. Megrendelhető a belföld számára az Akadémiai Kiadónál (Budapest, V., Alkotmány-utca 21. Bankszámla 04-878-111-48), a külföld számára pedig a »Kultúra« Könyv és Hírlap Külkereskedelmi Vállalatnál (Budapest, VI., Sztálin-út 21. Bankszámla: 45-790-057-50-032) vagy külföldi képviseleteinél és bizományosainál.

»Acta Microbiologica« публикует трактаты из области микробиологии на русском, французском, английском и немецком языках.

»Acta Microbiologica« выходит отдельными выпусками разного объема. Несколько выпусков составляют один том.

Предназначенные для публикации рукописи (в напечатанном на машинке виде) следует направлять по адресу:

Acta Microbiologica,
Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

По этому же адресу направлять всякую корреспонденцию для редакции.

Подписная цена »Acta Microbiologica« — 110 форинтов за том. Заказы принимает предприятие по внешней торговле книг и газет »Kultúra« (Budapest, VI., Sztálin-út 21. Текущий счет № 45-790-057-50-032), или его заграничные представительства и уполномоченные.

ACTA MICROBIOLOGICA

ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE

ADIUVANTIBUS

D. FEHÉR, J HORVÁTH, G. IVÁNOVICS, S. KOTLÁN, R. MANNINGER, A. PELC, J. SZIRMAI

REDIGIT

A. HAVAS

TOMUS I

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA

BUDAPEST, 1954

INDEX

Tomus I. Fasciculi 1—3.

Eörsi, M., Jablonszky, L. and *Milch, H.:* Significance of Bacteriophage in Infantile Enteral Infections. I — Эрши, М., Яблонски, Д. и Милх, Х.: Значение бактериофага у детей грудного возраста при энтеральных инфекциях. I. .. 1

Форноши, Ф. и Мольнар, Э.: Клещевой энцефалит в Венгрии. Изоляция вируса и его свойства — *Fornosi, F.* und *Molnár, E.:* Zeckenencephalitis in Ungarn. Isolation und Eigenschaften des Virus 9

Koczka, I.: Versuche über gleichzeitige Anwendung von Isonikotinsäure-Hydrazid und anderen gebräuchlichen Antituberkulosemitteln. I. — Коцка, И.: Опыты по совместному применению гидразида изоникотиновой кислоты (INH) с другими противотуберкулезными средствами. I. 23

Takátsy, Gy.: A Purified Precipitated Virus Obtained by a New, Simple Method. II — Такачи, Ю.: Осадок вирусов, изготовленных новым, простым способом. II. 35

Pazonyi, B.: Studies on Sporulation in Yeasts and Some Problems of Improving Yeast Strains — Пазоньи, Б.: Исследование спорообразования винных дрожжей и проблемы улучшения дрожжевых штаммов 49

Rauss, K. and *Kétyi, I.:* Comparative Studies on the Toxicity and Protective Value of S. flexneri and of its Isolated Somatic Antigen — Рауш, К. и Кетьи, И.: Сравнительные исследования по токсичности и иммунобиологическому действию Shigella Flexneri и его изолированного соматического антигена 71

Farkas, E. and *Dömök, I.:* Isolation of Influenza C Virus in Hungary — Фаркаш, Э. и Дэмэк, И.: Выделение типа »С« вируса гриппа в Венгрии 85

Dömök, I., Szafir, É. and *Farkas, E.:* Laboratory Investigations into the Influenza Epidemics of 1951 and 1952 in Hungary — Дэмэк, И., Сафир, Э. и Фаркаш, Э.: Лабораторное изучение эпидемии гриппа в 1951 и 1952 гг. в Венгрии 99

Szöllősy, E., Abrahám, A. and *Alföldi, L.:* Isolation of Influenza Virus Strains in Connection with the Epidemic in Szeged during the Year 1952 — Сэллэши, Э., Абрахам, А. и Альфэльди, Л.: Выделение штаммов гриппа во время эпидемии в г. Сегед в 1952 г. 111

Cserey-Pechány, É. und *Molnár, B.:* Untersuchungen des B_{12} Vitamingehaltes von Leberextrakten mit Anwendung elektrophoretischer und mikrobiologischer Methoden. — Череи-Пехань, Э. и Мольнар, Б.: Исследование количества витамина B_{12} в экстрактах печени применением электрофореза и микробиологических методов 115

Horváth, J.: Contributions to the Biology of Quantitative Changes in Antibiotic Production, Based upon Investigations on a Streptomyces Species — Хорват, Я.: Данные к биологии количественного изменения производства антибиотика, полученные исследованием одного вида Streptomyces 131

Bodon, L. et *Szent-Iványi, M.:* Sur le phénomène d'interférence entre différents virus de peste aviaire dans l'oeuf de poule embryonné — Бодон, Л. и Сент-Иваньи, М.: Явление интерференции между разными штаммами вируса чумы птиц в оплодотворенном курином яйце 141

Гаваш, А. И. и сотрудники: Антагонизм индивидуумов близких друг к другу видов, принадлежащих к одному роду в микробиологии. II — *Havas, A.* und *Mitarbeiter:* Antagonismus der Individuen nahestehender Arten desselben Geschlechtes in der Mikrobiologie II. 149

Párducz, B.: Reizphysiologische Untersuchungen an Ziliaten — Пардуц, Б.: Исследование физиологии раздражения у жгутиковых одноклеточных организмов I. 175

Török, P.: Mikroorganismen aus dem Wasser ungarischer Wasserleitungen. — Тэрэк, П.: Микроорганизмы из водопроводной воды в Венгрии 223

Pintér, M. und *Béládi, I.:* Die Züchtung des tschechoslowakischen Encephalitisvirus in Gewebekulturen — Пинтер, М. и Белады, И.: Разведение вируса чехословацкого энцефалита в тканевой культуре 243

Sektionseinleitende Vorlesungen auf dem I. Kongress der Ungarischen Mikrobiologischen Gesellschaft

Rauss, K.: Sieben Jahre ungarischer medizinischer Bakteriologie und Immunologie (1945—1951) 251

Manninger, R.: Übersicht über die veterinärmedizinische Literatur auf dem Gebiete der Bakteriologie und Immunitätslehre 1945—1951 265

Ivánovics, G.: Neuere Ergebnisse der Virusforschung in Ungarn 279

Kotlán, S.: Bericht über die Ergebnisse der parasitologischen Forschungsarbeit in Ungarn in den Jahren 1945—1951 289

Petrilla, A.: Aktuelle epidemiologische Fragen in Ungarn 298

Pelc, A.: Sieben Jahre der gewerblichen agronomischen Mikrobiologie in Ungarn 307

Fasciculus 4.

Vályi-Nagy, T.: Die Entwicklung der Antibiotikumforschung in Ungarn 313

Csillag, A.: Weitere Versuchsangaben über das Antibiotikum »Granegillin« — Чиллаг, А.: Новые экспериментальные данные об антибиотике »Гранегиллин« 321

Vajda, Gy., Goreczky, L., Roth, I. und *Sümegi, S.:* Über die zytotropische Wirkung auf Tumorzellen — Вайда, Дь., Горецки, М., Рот, И. и Шюмеги, И.: Цитотропное действие на опухолевые клетки 331

Surján, M., Richter, P. and *Réthy, L.:* Purification of Diphteria and Tetanus Toxoids by Trichloracetic Acid I and II — Шурьян, М., Рихтер, П. и Рети, Л.: Очистка дифтерийного и столбнячного анатоксина трихлоруксусной кислотой. Сообщ. I. и II. 339

Vajda, Gy. und *Backhausz, R.:* Wertmessung agglutinierender Immunsera mit der Filtrierpapiermethode — Вайда, Дь. и Бакхаус, Р.: Оценка агглютинирующих иммунных сывороток способом фильтровальной бумаги 349

Kesztyüs, L., Szilágyi, T. und *Gyulai, F.:* Nervensystem und Immunität I. Wirkung von Barbiturat-Dauerschlaf auf den Immunkörpertiter des Blutes — Кестьюш, Л., Силадьи, Т. и Дьюлаи, Ф.: Нервная система и иммунитет. Сообщение I. Влияние барбитуратного сна на титр антител крови 359

Kesztyüs, L., Szalay, S., Kocsár, L., Kertész, L. und *Salánki, J.:* Nervensystem und Immunität II. Können sich unter sekundenlanger Einwirkung von Antigenreizen spezifische Abwehrstoffe bilden? — Кестюш, Л., Салаи, Ш., Кочар, Л., Кертес, Л. и Шаланки, Я.: Нервная система и иммунитет. Сообщение II. Могут ли образовываться специфические антитела при нескольксекундном действии антигенного раздражения? 371

Backhausz, R. and *Neubauer, G.:* Studies in Haemolytic Disease of the Newborn — Бакхаус, Р. и Нейбауер, Дь.: Серологический диагноз гемолитических заболеваний новорожденных 377

Hussel, L.: Über den Erreger der Knochenaktinomykose des Rindes — Хуссел, Л.: Возбудители актиномикоза костей рогатого скота 391

Ábrahám, E., Koch, A. and *Ivánovics, G.:* On the Cyclic Multiplication of the Aujeszky's Disease Virus — Абрахам, Э., Кох, А. и Иванович, Дь.: Циклическое размножение вируса болезни Ауеского 423

Nógrády, G. and *Rodler, M.:* A Double Layered Polytropic Medium in the Diagnostics of Enteric Bacteria — Ноградн, Дь. и Родлер, М.: Двухслойная политропная питательная среда в диагностике кишечных бактерий 437

Fekete, L.: Die Wirkung diätischer Eiweisskomplettierung auf die Antitoxinproduktion bei mit Tetanusanatoxin immunisierten Kindern — Фекете, Л.: Влияние укомплектования системы питания белками на образование антитоксина у детей, иммунизированных столбнячным анатоксином 445

Darányi, Gy.: Untersuchungen über die Verbreitung der pathogenen Staphylokokken — Дараньи, Дь.: Исследования о распространенности патогенных стафилококков 453

Váczi L. und *Mihályfi, I.:* Über die gegen Corynebakterien antagonistischen Staphylococcus pyogenes-Stämme — Вацн, Л. и Михальфи, И.: Местонахождение и свойства штаммов Staphylococcus pyogenes, обладающих антагонистическими свойствами по отношению к бактериям группы Coryne 459

Farkas, E. and *Dömök, I.:* Aetiology of the 1953 Influenza Epidemic in Hungary — Фаркаш, Э. и Дэмэк, И.: Этиология эпидемии гриппа 1953 года в Венгрии 471

Horváth, S.: A New Sensitive Method of the Rolling Drum Type for Influenza Virus Titration — Хорват, И.: Новый чувствительный метод титрования гриппозного вируса в поворотном барабане 481

Horváth, S. and *Alföldi, L.:* A New and Sensitive Method of Phage Titration on Plastic Trays — Хорват, И. и Алфэльди, Л.: Новый чувствительный метод титрования фага на пластинках из пластмассы 495

Klement, Z.: A Bacterial Disease of Millet New for Hungary — Клемент, З.: Новое бактериальное заболевание проса в Венгрии 511

Mészáros, J.: Über einen Fall von Typenänderung des Virus der Maul- und Klauenseuche — Месарош, Й.: Изменение типа вируса рыльнокопытной болезни 517

Csillag, A. and *Brandstein, L.:* The Role of a Blastomyces Species in the Genesis of Interstitial Pneumonia of the Premature Infant — A preliminary report 525

ВВЕДЕНИЕ

С возрождением Академии Наук Венгрии открылась новая глава в истории венгерской науки. Ученые Венгрии всеми силами стремятся служить делу трудящегося народа и своими исследованиями способствовать созидательному труду построения социализма. Венгерская Народная Республика оказывает развитию научной жизни в стране огромную материальную и моральную помощь. Еще никогда в нашей истории наука не пользовалась таким уважением и такой поддержкой, как теперь. Одной из характерных черт возрожденной науки является связь между научной теорией и практической жизнью. Это взаимодействие оказывает глубокое плодотворное влияние на развитие нашей науки.

Изданием серии Acta Microbiologica Академия Наук Венгрии поставила себе целью способствовать углублению международных связей прогрессивной науки, дальнейшему развитию науки, делу мира и углублению дружбы народов.

INTRODUCTION

La renaissance de l'Académie Hongroise des Sciences ouvre un nouveau chapitre dans l'histoire de la vie scientifique hongroise. Les savants hongrois se consacrent tout entiers à la cause du peuple travailleur et aident, par leurs recherches, le travail créateur de l'édification socialiste. La République Populaire Hongroise contribue largement, sur le plan matériel et moral, au développement de la vie scientifique de notre pays. En Hongrie, le travail scientifique jouit d'une estime et d'un soutien tels qu'il n'en a jamais connu au cours de notre histoire. Une des caractéristiques de notre science en pleine renaissance est l'étroite union de la théorie scientifique et de la pratique dans la vie de notre pays. Cette influence réciproque contribue dans une mesure considérable au développement de notre vie scientifique.

En publiant la série des Acta Microbiologica l'Académie Hongroise des Sciences a voulu contribuer à l'élargissement des relations internationales dans le domaine de la science progressiste, au développement de la science, à la défense de la paix et du progrès et à l'épanouissement de l'amitié entre les peuples.

INTRODUCTION

The rebirth of the Hungarian Academy of Sciences has opened a new chapter in the history of Hungarian science. The scientists of Hungary endeavour in every way to serve the cause of the working people and to help with their research work in the creative task of building socialism. The Hungarian People's Republic affords vast help and encouragement to the development of the scientific life of our country, and scientific work in Hungary of to-day is honoured and aided to an extent that is unparalleled in the history of the land. One of the characteristic features of our reborne science is the connection between scientific theory and the practical life of the country. This interrelation has a profound stimulative effect on the development of our scientific life.

The aim of the Hungarian Academy of Sciences in starting the series of Acta Microbiologica is to contribute to the improvement of the international relations of progressive science, to the further development of science, to the cause of peace and progress, and to the closer friendship of the peoples.

EINLEITUNG

Die Wiedergeburt der Ungarischen Akademie der Wissenschaften eröffnete einen neuen Abschnitt in der Geschichte der ungarischen Wissenschaft. Die ungarischen Gelehrten sind stets bemüht, der Sache des werktätigen Volkes zu dienen, und mit ihren Forschungen die schöpferische Arbeit des Aufbaues des Sozialismus zu fördern. Zur Entwicklung des wissenschaftlichen Lebens in unserem Lande trägt die Ungarische Volksrepublik mit äusserst bedeutsamer materieller und moralischer Hilfe bei. In unserer Heimat wird die wissenschaftliche Arbeit in solchem Masse geschätzt und unterstützt, wie noch niemals in unserer Geschichte. Einer der charakteristischen Züge unserer wiedergeborenen Wissenschaft ist die enge Verbundenheit der wissenschaftlichen Theorie und der Praxis im Leben unseres Landes. Diese Wechselwirkung ist von fruchtbarem Einfluss auf die Entwicklung unseres wissenschaftlichen Lebens.

Mit der Ausgabe der Folge der Acta Microbiologica verfolgt die Ungarische Akademie der Wissenschaften das Ziel, zur Vertiefung der internationalen Verbindung der fortschrittlichen Wissenschaften, zur Weiterentwicklung der Wissenschaft, zum Frieden und zum Fortschritt, zur Sache der engeren Freundschaft zwischen den Völkern beizutragen.

SIGNIFICANCE OF BACTERIOPHAGE IN INFANTILE ENTERAL INFECTIONS*

I. ENTERITIS DUE TO E. COLI O 111 AND O 55

By

M. EÖRSI, L. JABLONSZKY and H. MILCH

State Institute for Public Health and Department of Pediatrics of the Munipical István Hospital, Budapest

Received July 2, 1953

Our previous investigations on bacteriophages *(Eörsi* [1]) followed three directions.

(i) Since 1949, the phage types of typhoid bacteria isolated in Hungary have been studied systematically. Strains obtained from about 3 900 individuals have been phagetyped. Identification of phage types allowed a systematical follow-up of the route of infection.

(ii) During the epidemic period, 200 samples of faeces were obtained for examination for dysentery, and typhoid. Pathogenic bacteria were recovered from 14, phages could be isolated from 47 of these samples, and 21 of the latter exerted a lytic action on various types of dysentery organisms, 13 lysed both typhoid and dysentery bacteria and only 13 were monovalent. Phages isolated from faeces are, because of their polyvalence, not always suitable for identifying or typing pathogenic organisms, but they are more reliable indicators of the existence of an epidemic than bacteriological tests. In this connection *Izvoztshykova* [2] has made investigations and found that in areas free from typhoid the water of cisterns contains a very small number of phages or none at all, while in areas where typhoid is endemic the phage content of cisterns rose parallel with the increase of the number of typhoid cases.

(iii) A method has been elaborated to elucidate the pathogenesis of enteral infections caused by unknown agents. The method consists in isolating the strains which, according to their cultural and biochemical properties, are not considered pathogenic. Subsequently, it was examined in parallel tests whether the faeces contain phages lysing any of the isolated strains.

In September 1950 an outbreak of diarrhoea of alimentary origin occurred. Thirty-eight faeces and a number of the suspected victuals were examined. A total of 50 E. coli species were isolated from the samples. From 20 of the 38 faeces phages lysing the E. coli strain recovered from one of the suspected victuals were isolated. The fact that a specific phage could be isolated from more than 50 per cent of the faeces permitted the conclusion that the outbreak was caused by the victual infected with the above mentioned strain. Subsequently

*Based on a lecture held at the Congress of Paediatrics, Szeged, October 4, 1952.

the strain was identified serologically, and was found to be identical with the E. coli O 19 strain.

Next, in the summer of 1951, an investigation into infantile enteral infections has been started, in which we intended,

(i) to carry out phage examinations together with the bacteriological tests for *known* pathogens of infantile enteral infections,

(ii) to identify the *unknown* pathogens of the disease by means of phage tests, and

(iii) to elucidate the eventual correlations existing between microbiological cultural results and clinical course of the disease by comparing the results of bacteriological and phage tests with the symptoms developed.

The following methods were used in the study.

a) Faeces of sick infants were inoculated on media commonly used for differentiation and isolation, and known pathogenic bacteria were identified.

b) Whenever possible, strains considered to be nonpathogenic on the basis of cultural properties were also isolated from stools.

c) Phages were grown in the following way. The faeces were mixed to 6 to 8 ml of yeast broth of pH 7,2 to 7,4. The amount of faeces was such as to obtain a turbidity similar to that of a 24 hour E. coli broth culture. The suspension was centrifuged at 2,000 r. p. m. for 10 minutes. The supernatant presumably containing the phage was placed in a water bath of 60° C for half an hour, in order to eliminate bacteria. Then the material was kept at 4° C until tested for phage.

d) Phage demonstration was carried out in the following way. Agar plates were inoculated with 2 to 2½ hour cultures of standard strains of known pathogens as well as with strains recovered from stools. By means of a loop 4 mm in diameter circular inoculations about 1½ cm in diameter were made with material from broth cultures of each strain. 12 to 16 strains could be grown on each plate. When, after approximately 6 to 10 minutes the broth cultures on the agar plate were dry a large loopful of the above mentioned supernatant was added to each of them. The results were read after an 8 hour period of incubation at 37° C.

In the preliminary studies phages lysing typhoid bacteria and various strains of dysentery bacilli were determined in the first place, but attention was focussed also upon phages lysing bacteria which had not been considered pathogenic. In the first step, strains isolated from a sample of faeces were tested against phages recovered from the same material. Subsequently phage tests were set up against a number of strains isolated from the faeces of other babies, strains which were suspect of being pathogenic in view of their previously demonstrated sensitivity to phages. The sixteenth test already yielded a strain which was lysed by the phage originating from the same sample of faeces. This strain, designated Cx, was later on introduced as another standard in the investi-

gations. The phage was propagated on this strain. Thereafter, the presence of phages lysing strain Cx was a regular occurrence in the faeces received for testing. At that time, we had been unable to explain this phenomenon, but later on it was revealed that strain Cx was sensitive also to phage O 55.

From January 2, 1952, on, strains of E. coli O 111 and O 55 were also included in the tests, along with the other standard strains. On the 24th of the same month a phage lysing the standard E. coli O 111 strain was detected in one of the faeces. Later on, the E. coli O 111 strain isolated could be identified in the same sample also by the agglutination method. From then on, the method described above was supplemented with identification by means of agglutinating »O« sera 111 and 55, obtained from the Microbiological Department of the Budapest and Pécs Medical Universities.

Because of technical difficulties it was not possible to carry out simultaneous tests for E. coli enteritis at the Department of Paediatrics. It was, however, revealed during the very first days that several of the babies were infected with E. coli O 111, and one with E. coli O 55. The necessary protective measures were introduced to prevent an epidemic at the Department. Until February 25, the end of the outbreak, 34 of the patients proved to have been infected with the above strains. The bacteriological and clinical observations made during the period of the outbreak have been dealt with elsewhere [3, 4].

In the present paper the results of phage examinations carried out during and after the outbreak (until July 25), are summarized. To our best knowledge, we were the first to isolate specific phages of coli O 111 and O 55[1]. In 13 cases phages specific for E. coli O 111 and in 2 cases phages specific for E. coli O 55 were isolated. Phages specific for E. coli O 111 originated from faeces yielding non-motile E. coli O 111 strains. From faeces containing the specific phage of E. coli O 55, E. coli O 55 strains possessing H6 antigen were grown.

The number and results of the examinations are tabulated in Table 1.

Table I

Material examined

Period	Number of			
	cases	faeces	cases	faeces
	tested		positive E. Coli O 111 and O 55	
Period of outbreak Jan. 25—Febr. 25, 1952	53	281	33	147
Post-epidemic period Febr. 25—July 25, 1952	366	1742	74	556

[1] »We have produced specific, adapted coli phages in te first half of 1952. Then we have learned in June, 1953, from an abstract (Excerpta Med. Section IV, No. 3) that P. *Nicolle* et al. had reported of similar studies (Bull. Acad. Med. *136*. 1952.).«

The isolated phages were designated as follows.

a) Specific phage, those lysing only E. coli O 111 or O 55 strains.

b) Polyvalent phage, those lysing in addition to a particular strain of E. coli also other species of colon bacteria, mainly those of dysentery.

c) Non-specific phage, those lysing bacteria other than the E. coli strains causing enteritis.

On comparing the results of the tests with the clinical picture it has been found that at the time when a specific phage could be isolated from the faeces, the baby was clinically ill (Table II). A specific phage was never isolated from stools of temporary carriers. Although not shown in the Table, it has been found that faeces of temporary carriers did not contain specific phages even if they have yielded pure cultures of bacteria.

Table II

Occurrence of bacterium and phage in cases with different clinical courses

Period	Clinical course	E Coli 0 111			E Coli O 55		
		bacteriologically positive cases					
		Total number	Number of cases yielding		Total number	Number of cases yielding	
			specific	polyvalent and non-specific		specific	polyvalent and non-specific
			phage cultures			phage culture	
Epidemic	Serious	8	6	2	2	1	1
	Medium	3	3	—	1	—	1
	Mild	7	4	3	1	1	—
	Temporary carrier and host	1	—	—	7	—	4
Post epidemic	Serious	7	—	3	3	—	3
	Medium	8	—	7	1	—	1
	Mild	17	—	11	22	—	14
	Temporary carrier and host	6	—	—	7	—	3

Thus, the presence of the specific phage was always a sign of clinical disease. There are several possibilities to explain this fact.

a) One of the possibilities is that the phage itself plays a role in the development of clinical symptoms. This could be imagined in two ways. One of them is that a sudden release of endotoxin from bacteria destroyed by phage action would give rise to the toxic symptoms. The other mechanism is connected with the observations of *Freeman* [5], *Parsons* and *Frobisher* [6], as well as

of *Freeman* and *Morse* [7], who have recently pointed out that diphtheria organisms that had lost their virulence can be made virulent by treatment with phage.

b) The other possibility is that the appearance of the specific phage is only a concomitant of the disease, while the severity of the infection would be due to the excessive multiplication and consequent destruction of bacteria, in consequence of which phages would appear and excessively increase in number.

Many of our observations seem to support the first possibility. Thus the faeces of healthy carriers yielded pure cultures of that pathogenic agent, but without a specific phage. Serial examinations carried out in a nursery not connected with the Hospital revealed that from among 32 babies the faeces of one yielded E. coli O 111 and those of 3 others E. coli O 55, one of the latter in a pure culture. None of the faeces contained a specific phage. The infants examined were all healthy and remained so during subsequent observation. The faeces of the three month old baby of one of the doctors of the Department yielded at intervals pure cultures of either E. coli O 111 or E. coli O 55, although the infant was always healthy. In none of the stools could we detect a phage. Equally in favour of the first possibility is the observation that when on treatment with chloromycetin improvement set in, the phage disappeared always before, or at the same time as the bacterium, but never after it.

We have been unable to find data on the simultaneous occurrence of phage and E. coli. Our results, however, seem to indicate that beside the bacterium, the phage may play an important role in eliciting clinical disease.

We have made, on the other hand, also contradictory observations. The specific phage cannot always be detected in the faeces of clinically ill infants, in spite of the presence of E. coli (Table II). At the beginning of the investigations the significance of this fact had not yet been clear and therefore every case had not been analysed from this respect during the actual illness. On subsequent revision it was found that the faeces of most of such patients contained polyvalent or non-specific phages. In other cases, in which phages could not be demonstrated, the symptoms could be ascribed to parenteral causes.

The attention of every researcher has been engaged by the question why in one instance a domestic outbreak results from the infection, while in another instance only sporadic cases occur. Most of the authors suggest that for the epidemic character an unknown factor is responsible and many suppose a concomitant viral action.

On the basis of our experimental results, two statements are contributed to this problem.

(1) During the outbreak, in most of the cases due to E. coli O 111 the non-flagellate variant of that strain was isolated, while during the sporadic period after the epidemic the variants possessing flagellae predominated (Table III). Observers of other outbreaks reported similar results.

(2) In none of the cases occurring in the post-epidemic period could a specific phage be isolated (Table II).

It would be premature to draw conclusions from these observations. Nevertheless, the search for facts relative to epidemiology will be continued.

In the possession of phages lysing bacteria other than the known pathogens, it was possible to prepare phages suitable for studying the finer structure of strains. The technique of phage adaptation was essentially identical with that employed in 1938 by *Craigie* and *Yen* for differentiating according to phage types typhoid bacteria containing the Vi antigen [8].

We have attempted to differentiate E. coli O 111 and O 55 strains by the phage-typing method. Data in Table IV show that strain O 111 : B4 (the one responsible for the outbreak in Pécs and at the István Hospital) was completely lysed by the phage isolated and adapted during the period of the outbreak. Variant H 2 could be sensitized to one of the adapted phages. Although variant H 2 is capable of causing diarrhoea, it did not participate in the epidemic. Until recently, it was thought of variant O 111 : B 4 : 12 that it was sensitive to no phage. All our attempts to obtain a phage adaptable to this strain have failed. Recently we have obtained a phage-sensitive variant of strain H 12. This method lends itself for identifying each of the three known variants of strain O 111.

Table III

Antigenic structure of cultured *E. coli* strains

Period	Of cultured strains								
	111 : B4				55 : B5				111 : B4 and 55 : B5 *
	number of those possessing								
	H—	H2	H12	?	H—?	H6	?	?	?
	antigenic structure								
Epidemic	15	3	—	1	1	6	2	—	3
Postepidemic	6	21	1	10	10	7	16	3	—

Note: During the epidemic period in two cases phage alone could be demonstrated.
*The strains occurred together.

According to the *Kauffmann* scheme, strain O 55 has only two antigen variants. By means of phage sensitivity tests we succeeded in identifying three variants of that strain. During and after the epidemic the faeces frequently contained a phage completely lysing strain Cx. On further investigation it was revealed that the phage adapted to strain O 55 was capable of lysing in plaques strain Cx, too. It is evident, that the strains Cx and O 55 possess a common, phage-sensitive component. It is also possible that the strain Cx is a fourth variant of strain O 55 (Table IV).

Table IV

Classification of E. coli O 111 and O 55 strains, according to phage sensitivity

Kauffmann's classification	Phage				
	a	b	k	l	x
111 : B4 : —	CL	CL	—	—	—
111 : B4 : 2	—	CL	—	—	—
111 : B4 : 12*	—	—	—	—	—
	—	—	CL	CL	—
55 : B5 : 6	—	—	CL	—	—
	—	—	—	CL	—
Cx	—	—	+++	—	CL

*Recent results are not shown.

Interpretation of signs:

Phage a = cultured from stool, propagated on strain O 111 : B4 : — cultured from patient
Phage b = cultured from stool, propagated on standard O 111 strain.
Phage k = cultured from stool, propagated on standard O 55 strain.
Phage l = cultured from stool, propagated on strain O 55 : B5 : 6 cultured from patient.
Phage x = culture from stool, propagated on *E. coli* strain cultured from a patient with enteritis.
CL = confluent lysis.
+++ = many minute plaques.

SUMMARY

1. To our knowledge, we were the first to identify the specific phages of the E. coli strains O 111 and O 55*[1]

2. A specific phage was detected only in infants showing the symptoms of infantile enteritis. No specific phage was ever found in the faeces of temporary carriers. Such a consequent appearance of the specific phage is suggestive of the possibility that the phage may also play a part in the development of symptoms, and calls for research work along these lines.

3. While we have succeeded in isolating phages during the epidemic, we have f iled to do so from sporadic cases. Investigations into the eventual epidemiological significance of phages form our next aim.

4. It has been pointed out that by means of phage sensitivity tests it becomes possible to identify such strain variants which up to now could not be differentiated from each other by serological methods.

Acknowledgement. We are greatly indebted to Professor *Rauss* for his invaluable assistance in carrying out the serological analysis of the antigenic structure of the strains discussed and thereby enabling us to elaborate the method of phage typing.

*[1] See footnote on Page 3.

LITERATURE

1. *Eörsi M.:* Népegészségügy **8**, (1950).
2. *Извощикова А. Б.:* Гигиена и Санитария **2**, (1952).
3. *Lukács J.:* Session of the Pediatry Committee, February 9, 1952.
4. *Lukács J.* and *Jablonszky L.:* Gyermekgyógyászat **5**, (1952).
5. *Freeman V. J.:* J. Bact. **61**, 675 (1951).
6. *Parsons E. I.* and *Frobisher M. Jr:* Proc. Soc. Exper. Biol. Med. **78**, 746 (1951).
7. *Freeman V. J.*and *Morse I. U.:* J. Bact. **63**, 407 (1952).
8. *Craigie J.* and *Yen C. H.:* Canad. Publ. Health J. 29, 448 (1938).

ЗНАЧЕНИЕ БАКТЕРИОФАГА У ДЕТЕЙ ГРУДНОГО ВОЗРАСТА ПРИ ЭНТЕРАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЯХ

М. Эрши, Л. Яблонски, Х. Милх

Резюме

1. Поскольку нам известно, нами впервые обнаружены специфические фаги coli 111 и coli 55.

2. В случаях нами исследованных, появление специфического колифага в кале замечено только при наличии симптомов dyspepsia coli у детей грудного возраста. В кале переходных бацилло-носителей нам ни разу не удалось обнаружить специфический фаг. Такое последовательное появление специфического колифага дает возможность сделать вывод, что фаг играет роль в развертывании симптомов болезни, поэтому исследование в этом направлении, в целях выяснения патогенеза, считаем весьма важным.

3. Так как нам не удалось выявлять специфический колифаг в случаях спорадических заболеваний не вызывающих эпидемию, а только во время эпидемии, то предметом наших дальнейших исследований является исследование эпидемиологического значения фага.

4. Указываем, что применяя при исследованиях фагсенсибилизацию можно отличить и такие варианты, которых до сих пор нельзя было серологическими методами отличить друг от друга.

КЛЕЩЕВОЙ ЭНЦЕФАЛИТ В ВЕНГРИИ. ИЗОЛЯЦИЯ ВИРУСА И ЕГО СВОЙСТВА

Сообщение Венгерского Гос. Института Здравоохранения

Ф. ФОРНОШИ и Э. МОЛЬНАР

Поступило 9. июля 1953 г.

В раннее опубликованной статье мы сообщили о результатах исследований, на основании которых мы пришли к выводу, что в этиологии имеющих место в Венгрии инфекционных болезней, поражающих нервную систему, нужно считаться также и с вирусом клещевого энцефалита (1).

У нас имеются сведения о 55 случаях заболеваний, имевших место в 1950 г. и о 26 случаях заболеваний, имевших место в 1951 г. во время эпидемий менингоэнцефалита в одном из западновенгерских городов, расположенном в лесистой местности. В большинстве случаев клинические симптомы болезни соответствовали серозному менингиту, но были и случаи, сопровождающиеся симптомами энцефало-менингита и полирадикулита. Часто заболевание по своему течению можно было разделить на две фазы. В большинстве случаев заболевание оканчивалось полным выздоровлением. В 1951 г. в трех случаях наступала атрофия мышц плечевого пояса и проксимальной части верхних конечностей (рис. 1), в одном случае тугоухость, в одном случае атрофия люмбальной части длинного мускула спины. Заболевания имели место с весны до поздней осени с увеличением их числа весной и поздним летом. При исследовании этиологии эпидемии 1951 г. нам не удавалось обнаружить вирус ни у больных, ни в клещах. Сыворотка реконвалесцентов, однако, нейтрализовала чехословацкий штамм клещевого энцефалита. Из 12 партий мышей, которым была привита растертая суспензия клещей *Ixodes ricinus*, 2 партии оказались иммунными по отношению к чехословацкому штамму клещевого энцефалита, когда мы шесть недель спустя заражали их этим вирусом. Иммунными оказались также и те две группы мышей, которым мы прививали кровь или спинномозговую жидкость больных в ранней стадии заболевания, когда мы их шесть недель спустя заражали вышеуказанным вирусом.

Весной 1952 г. Институт послал новую экспедицию с целью непосредственного установления зараженности клещами области, где имела место эпидемия. Изучению были подвергнуты 2485 клещей, разделенных на 49 партий, собранных в эндемическом очаге (2). Из двух партий используемого материала удалось изолировать вирус, вызывающий на мышах энцефаломиэлит. Эти два штамма клещевого энцефалита, выделенных в Венгрии, обозначены нами, как штаммы $КЭв_1$ и $КЭв_2$.

Выделение вируса

$КЭв_1$: При помощи небольшого количества кварцевого песка мы, после усыпления эфиром, растерли 32 голодных самок, 3 самца и 60 нимф

клещей *Ixodes ricinus L.*, собранных в тот же день, 29 апреля 1952 г. Затем мы приготовили взвесь на 1 мл. физиологического раствора. Взвесь мы отцентрифугировали при 1500 оборотах в минуту. Надосадочную жидкость мы вводили внутрицеребрально пяти пятидневным, четырем трехнедельным и четырем пятинедельным мышам. Как видно на нижеприведенном рис., во всех трех группах мышей на 6—8. день после заражения имели место заболевания, далее заболели и погибли те мыши, которым был привит мозг мышей, не давших симптомы заболевания. Из мозга больных и погибших или убитых мышей не удалось получить культуру бактерий. Возбудителя мы сохраняем в жизни при помощи внутрицеребральных прививок на белых мышах.

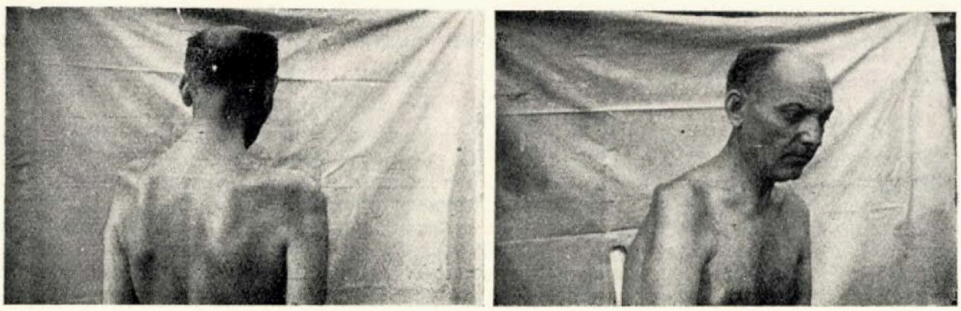


Рис. 1. Атрофия мышц плечевого пояса через 14 месяцев после начала болезни

КЭв$_2$: 294 нимф *Ixodes ricinus L.* собранных 2. мая мы промывали в течение пяти минут эфиром и затем пять раз дестиллированной водой, после чего мы растерли их песком и суспендировали в 0,6 мл. физиологического раствора поваренной соли. После прибавления небольшого количества пенициллина и стрептомицина мы отцентрифугировали взвесь в течение двух минут на центрифуге, при 1500 оборотах. Надосадочная жидкость вводилась внутрицеребрально четырем трехнедельным и четырем пятинедельным мышам. На пятый день первого пассажа заболела одна трехнедельная мышь. Сохранение вируса путем прививок мозга мышей не представляло трудностей. В мозге мышей, использованных для пассажа, бактерий не были обнаружены.

Восприимчивость лабораторных животных и клинические симптомы

Белые мыши. При первых пассажах восприимчивость молодых животных по отношению интрацеребральной инфекции оказалась большей, чем у взрослых животных (рис. 2). Клинические симптомы были при первых 4—5 пассажах в случае применения обоих штаммов довольно

разнообразные; раздражительность, походка на цыпочках неуверенная, шатающаяся походка, нарушение координации, параличи. Позднее, на передний план все больше стали появляться параличи конечностей преимущественно спастического типа. Парализованные задние конечности находились чаще всего в состоянии флексии (рис. 3). Наиболее раннее проявление симптомов имело место через 4 дня, но в большинстве случаев они стали проявляться после 5—6-дневного инкубационного периода. После 1—2-дневного существования этих симптомов появляется прострация и мышь погибает. Редкими являются случаи, когда параличи задних конеч-

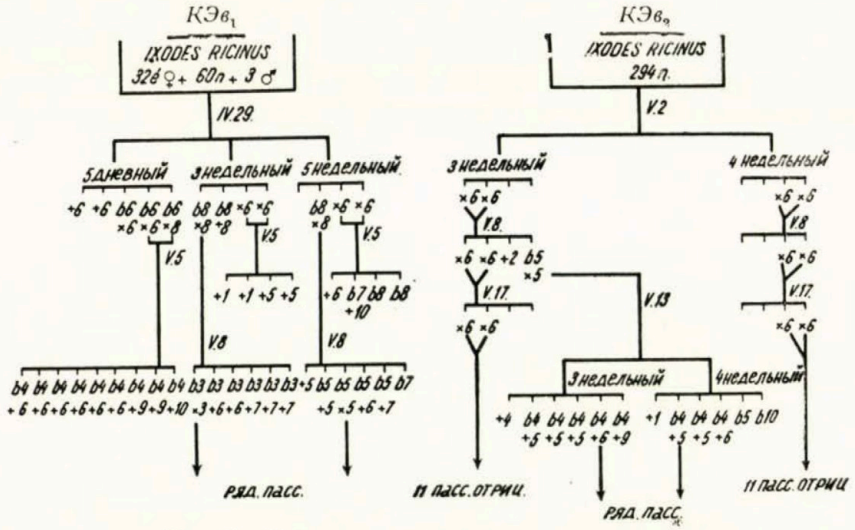


Рис. 2. Изоляция двух штаммов вирусов

Легенда: é — Клещи голодные, п — нимфы X6 — убитые на 6. день после заражения: b4 — заболевшие на 4. день после заражения; +5 — погибшие на 5. день после заражения; Время наблюдения заболевших, но не погибших и не убитых животных, оставшихся парализованными — 4 недели. Каждая зубчатая вертикальная линия означает 1 мышь

ностей принимают стойкий характер, процесс приостанавливается и животное остается живым с парализованными конечностями (рис. 2). Если параличи протекали менее тяжело, наступало кажущееся полное выздоровление животного. Срок наблюдения 4 недели. После внутрицеребрального заражения животных DL_{50} находится в большом разведении (10^{-8}), но при каждом титровании бывали случаи, что и при меньших разведениях (10^{-3}) некоторые мыши оставались в живых, которые заражались этим материалом. После 17. пассажа штамма $КЭв_2$ мы уже не наблюдали таких колебаний.

Другие методы заражения: У зараженных интраназально, внутривенно, внутрибрюшинно, внутримышечно и подкожно мышей, появлялись типичные симптомы заболевания. Также заболевали и погибали мыши, однократно кормленные хлебом, пропитанным молоком, содержащем 10%

вирусов. В течение 28 дней не наблюдалось заболевание незараженных мышей, державшихся вместе с зараженными внутрицеребрально мышами.

В первый день заболевания зараженных интрацеребральным путем мышей мы исследовали ряд органов на содержание в них вируса: кровь, печень, селезенку, почку, надпочечник и легкие. Пять больных мышей мы обескровили через подмышечные сосуды, кровь, пополам смешанную дестиллированной водой, мы набрали в шприцы. Тождественные органы мы смешали, промывали физиологическим раствором поваренной соли и 10%-ную взвесь растертых органов, также и смешанную с дестиллированной водой кровь вводили внутрицеребрально четырем мышам. Вирус был обнаружен во всех органах.

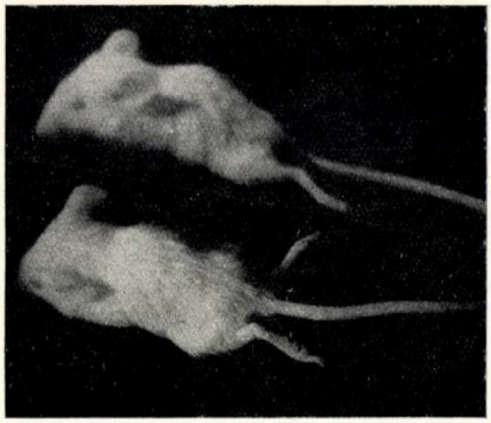


Рис. 3. Интрацеребрально зараженная мышь на 6. день после заражения

Хомяк (Mesocricetus auratus W.). Зараженные внутрицеребрально 10%-ной взвеси штамма КЭв$_2$, полученного из 16. пассажа через мышей 8—10 дневные и взрослые хомяки заболевали и погибали на 5—8. день. Бросался в глаза паралич задних конечностей у хомяков. Прививка взвеси из мозга этих животных вызывала заболевание мышей и хомяков и их гибель при вышеуказанных симптомах.

Белые крысы. Пятерым пятинедельным белым крысам было внутрицеребрально привита взвесь из мозга мышей после 12. пассажа (штамм КЭв$_1$). Из пяти крыс две крысы погибли на второй и одна на третий день без симптомов заболевания. 2 крысы остались в живых. Мозг погибшей на третий день крысы был стерильным в бактериологическом отношении. Из шести мышей, которым была привита взвесь из мозга крыс, пять заболели при характерных для этой болезни симптомах и погибли. Пять крыс, зараженных этим же материалом в течение трех недель не показали никаких симптомов заболевания. Из пяти крыс, зараженных материалом

18. пассажа, одна погибла на третий день. У трех крыс, зараженных штаммом КЭв$_2$ не наблюдались никакие симптомы заболевания.

Морские свинки. Материал 8. пассажа через мышей (штамм КЭ в$_1$.) введенный пятерым морским свинкам весом приблизительно 250 г. внутрицеребрально, не привел к заболеванию морских свинок.

Бараны. 10%-ной взвесью мозга мыши, бактериологически стерильной и содержащей вирус (КЭв$_1$) мы интрацеребрально заразили одного шестинедельного и пятерых 6—7 месячных баранов и штаммом КЭв$_2$ — двух 6—7 месячных баранов. Температура животных начала повышаться

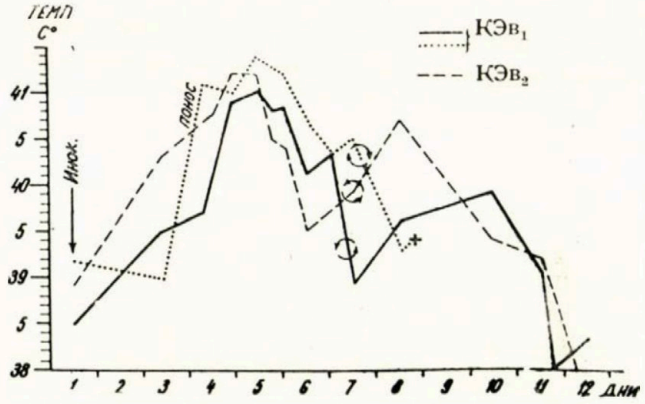


Рис. 4. Характерная температурная кривая интрацеребрально зараженных баранов Стрелы указывают на день появления »вертячки« и на его направление

на второй, но в большинстве случаев только на третий день инфекции и на 4—5. день она достигла максимума, затем наступало литическое падение температуры и на 8—10. день новое, но меньшее повышение температуры. Явления со стороны нервной системы наступили после первого снижения температуры (рис. 4). Клинические симптомы были у пяти баранов одинаковые: потеря аппетита, вялость и нарушение координации движения. Последний симптом является самым характерным для клинической картины заболевания. Уже на 3—4. день после заражения не отходят от стены, голова у них склонена на бок, в области, иннервируемой лицевым нервом, временами, появляются мышечные подергивания, временами тремор, распространяющийся на всю голову. Стоя, они расставляют передние ноги. Животные двигаются в ту сторону, в которую наклонена голова и если мы пытаемся тащить их в обратную сторону, то они сопротивляются. Временами появляются судороги, распространяющиеся на все тело животных. Голову они в таких случаях запрокидывают, ногами упираются в землю, как будто бы их что-то тянет вперед. За такими судорогами на 6—7. день после заражения следует характерная »вертячка«, причем темпы ее все

ускоряются, а круг все суживается и наконец осью круга являются задние конечности животного, после этого животное падает на землю, барахтается. Если ему удается встать на ноги, то опять начинается »вертячка« пока животное вновь не падает на землю. Эта »вертячка« длится несколько минут и повторяется через 30—60 минут (рис. 5). После этого мышечный тонус и сухожильные рефлексы усилены. Появляющийся в подобных случаях нистагм, может иногда быть первым признаком приступа. Приступы наступают в течение 3—4 дней с одинаковой частотой, затем они наступают все реже и через две недели после заражения, у животного не наблюдаются симптомы болезни. В одном случае болезнь у барана затянулась и животное еще на 5-ой неделе после заражения, как пьяное иногда покачивалось.

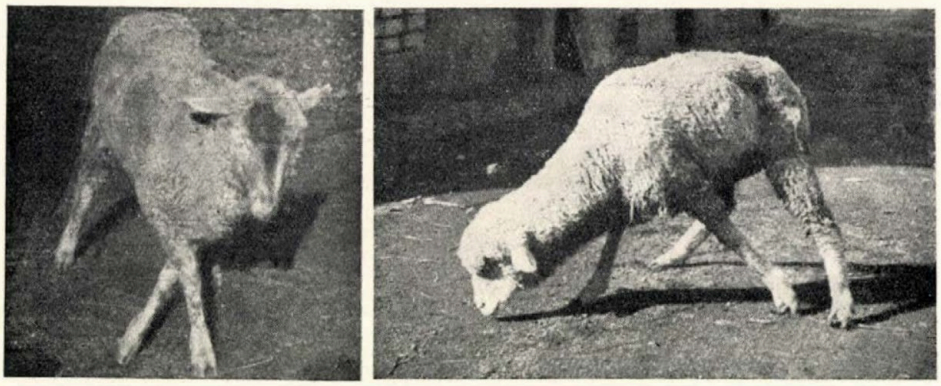


Рис. 5. Интрацеребрально зараженный баран на 7. день после заражения

В двух случаях течение заболевания отклонялось от вышеописанного. Одновременно с падением температуры общее состояние настолько ухудшалось, что животные лежали неподвижно, как трупы. Одно из них погибло, другого мы обескровили. Из восьми баранов 5 выздоровело, 1 погиб и 2 мы обескровили.

Патолого-анатомические изменения

Макроскопически на исследованных подопытных животных помимо нервной системы изменений не наблюдалось. У баранов мозговые оболочки полнокровные, в Аммоновом роге, в мостике и в спинном мозгу помимо полнокровия наблюдаются точечные кровоизлияния. В боковом желудочке мозга одного из баранов было кровоизлияние.

Гистологически мы исследовали до сих пор более грубые изменения в головном и в спинном мозгу баранов и мышей (подробное исследование

еще не произведено и поэтому высказываемое здесь мнение мы считаем лишь предварительным). Изменения носят воспалительно-дегенеративно-пролиферативный характер и локализуются главным образом в областях моста, мезэнцефалона, серого вещества ствола и спинного мозга. Диффузное размножение глии наблюдается и в коре мозга, но менее выражено, чем в подкорковых областях, где видны периваскулярные инфильтраты и узелки глии, но диффузный характер пролиферации глии заметен и здесь. В мозжечке наблюдаются дегенеративные изменения в клетках Пуркинье. В спинном мозгу видны наряду с дегенеративными изменениями в двигательных клетках и с нейронофагией, также и диффузные кровоизлияния. Периваскулярные инфильтрации распространяются также и на белое вещество.

Культивируемость

Вирус хорошо выращивается введенный в желточный мешок 6—8 дневных куриных яиц и в культуре ткани куриного зародыша, по Майтланду. Вирус может выращиваться также и на тканевой культуре по Майтланду, содержащей мозг человеческих зародышей.

Устойчивость вируса по отношению к температуре

Титр мозгового вещества мышей, хранившегося в течение 60 дней при температуре — 70°С не меняется. Исследуя 1 процентную, вирусную взвесь, содержащую 10% кроличьей сыворотки, заготовленную на физиологическом растворе поваренной соли, отцентрифугировав ее и интрацеребрально вводя мышам надосадочную жидкость, мы обнаружили, что после двухминутного кипячения материал теряет свою способность заражать мышей. При 70°С—10 минут, при 56°С — 60 минут, при 37° — 48 часов, при +4°С — способность заражать мышей была обнаружена и спустя 8 дней (табл. I).

Таблица 1

Установление устойчивости вируса температурным воздействиям путем интрацеребрального заражения мышей

Т.	2 минуты	10 минут	30 минут	60 минут	24 часа	48 часов	7 дней
100°С	0/4	—	—	—	—	—	—
70°С	—	1/4	—	—	—	—	—
56°С	—	—	2/4	1/4	—	—	—
37°С	—	—	—	—	4/4	2/4	—
комнатная	—	—	—	—	4/4	4/4	—
4°С	—	—	—	—	4/4	4/4	2/4

Числитель дробей указывает на количество погибших, знаменатель — на количество зараженных животных

Сравнивание вируса с чехословацким штаммом клещевого энцефалита

Сравнение мы произвели путем пробы перекрестной иммунизации и пробы нейтрализации вируса. Вакцину мы изготовили только из чехословацкого штамма и из штамма КЭв$_1$ (10. пассаж). Метод был в обоих случаях одинаковым. Заболевших на 4. день после интрацеребрального заражения характерными симптомами параличей мышей мы убили через 24 часа после возникновения симптомов путем охлаждения (мы поместили их на один час в рефрижератор). Мозг животных мы сохраняли в течение 10-ти дней при температуре — 70°С и затем после быстрого оттаивания мы изготовили содержащим 0,5% формалина физиологическим раствором 10%-ную взвесь, которую мы хранили затем еще 10 дней при температуре +2—4°С, получив таким образом вакцину. Вакцину мы продолжали хранить при температуре +2—4°С. Иммунизацию мы провели разведенной 1 : 10 вакциной, вводя через день (6 раз) по 0,25 мл. внутрибрюшинно мышам, весом 14—17 г. На 23. день после первой прививки вакцины мы интрацеребрально заражали мышей. В качестве контроля мы провели в отличие от обычного иммунизацию взвесью нормального мозга мышей, подвергавшийся такой же обработке, как и вакцина. Кроме того, мы заражали разведенным в физиологическом растворе вирусом мышей, не подвергшихся иммунизации. Полученные результаты мы привели на табл. 2.

Таблица 2

Проба перекрестной иммунизации на мышах между венгерским и чехословацким штаммами клещевого энцефалита

Вакцина	Заражение штаммом	Разведения вируса						
		10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
КЭв$_1$	КЭв$_1$	4/6	4/6	2/6	2/6	2/6	—	—
КЭ чехосл.	,,	2/6	1/5	3/6	3/6	1/5	—	—
Норм. мозг	,,	—	—	2/4	4/4	1/4	3/4	1/3
Контроль	,,	—	—	4/4	3/4	4/4	3/4	1/4
вируса	КЭ чехосл.	4/6	2/6	3/5	2/6	4/5	—	—
КЭв$_1$	,,	—	1/6	3/6	4/6	5/6	—	—
Норм. мозг	,,	—	—	3/3	4/4	2/4	4/4	4/4
Контроль вируса	,,	—	—	4/4	4/4	4/4	4/4	3/3

Числитель дробей указывает на количество погибших, знаменатель — на количество зараженных животных

Пробу нейтрализации вируса мы произвели двумя венгерскими (КЭв$_1$ и КЭв$_2$) и чехословацким штаммами клещевого энцефалита по методу Олитского и Казалс (3). Одна сыворотка получена от человека, заболевшего

менинго-энцефалитом в районе эпидемии, другая сыворотка взята от человека, заразившегося чехословацким штаммом клещевого энцефалита (4). В обоих случаях взятие крови было произведено приблизительно через год после заболевания. В качестве контроля мы использовали кровь человека, который, поскольку он знает, не болел заболеваниями нервной системы.

Таблица 3

Нейтрализация венгерского и чехословацкого штаммов клещевого энцефалита сыворотками реконвалесцентов на мышах

Сыворотка	Разведения вируса штамма КЭв$_1$						Индекс нейтрализации
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	
»1«	0/4	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4	>10.000
»2«	3/4	2/4	1/4	0/3	0/4	1/4	500
Контроль	3/4	4/4	4/4	4/4	2/4	1/4	

Сыворотка	Разведения вируса штамма КЭв$_2$						Индекс нейтрализации
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	
»1«	1/4	0/3	0/4	0/4	0/4	0/4	>1.000
»2«	3/4	3/4	1/4	0/4	0/4	0/4	100
Контроль	4/4	3/4	2/4	2/4	2/4	0/4	

Сыворотка	Разведения вируса штамма КЭ (чехосл.)						Индекс нейтрализации
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	
»1«	3/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	>1.000
»2«	3/4	2/4	0/3	0/4	0/4	0/4	>1.000
Контроль	3/4	4/4	3/4	4/4	3/4	1/4	

Сыворотка »1« взята от человека, переболевшего во время эпидемии менинго-энцефалитом. Взятие крови было произведено приблизительно через 1 год после болезни.

Сыворотка »2« взята от человека, заразившегося чехословацким штаммом клещевого энцефалита. Взятие крови было произведено приблизительно через 1 год после болезни.

Контрольная сыворотка взята от взрослого человека, который, насколько он помнит, никогда не страдал заболеваниями нервной системы.

В дробях числитель указывает на количество погибших животных, знаменатель — на количество зараженных животных.

Обсуждение результатов

Гистологические изменения, вызываемые изолированным нами вирусом, безусловно указывают на то, что вирус вызывает у подопытных животных энцефало-миэлит. Среди распространяемых клещами энцефало-

миэлитов до сих пор известны весенне-летний клещевой энцефалит и *Louping ill.* Таких специфических патологоанатомических изменений, на основании которых можно было бы точно идентифицировать вирус, мы до сих пор не обнаружили. Оценка патологоанатомической картины требует, однако, подробного изучения, принимающего во внимание также и динамику развития этих изменений.

Что касается патогенности для животных, то мыши, хомяки и бараны в равной степени восприимчивы по отношению к весенне-летнему энцефалиту и к *Louping ill,* в то время, как морские свинки невосприимчивы к этим заболеваниям. Исключением является в этом отношении сообщение Крейчи (5), требующее поэтому дальнейшего выяснения, согласно которому ему удалось изолировать несколько штаммов вирусов из больных и из клещей на мышах и морских свинках. На белых крысах вирус *Louping ill* вызывает инаппарентное заражение, животные не заболевают, но в центральной нервной системе может быть обнаружен вирус (6, 7). С этим совпадает наше наблюдение, что в мозге погибшей на 3. день белой крысы был обнаружен вирус. Согласно Шубладзе (8) диференциация вируса клещевого энцефалита от вируса *Louping ill* облегчается заражением хлопковых крыс, восприимчивых к вирусу *Louping ill,* но не восприимчивых к вирусу весенне-летнего клещевого энцефалита.

Венгерские штаммы весенне-летнего клещевого энцефалита мы сравнивали с чехословацким штаммом (Ржи) (9) путем проб перекрестной иммунизации и нейтрализации вирусов. При перекрестной защите обе вакцины оказали защитное влияние, как по отношению к гомологической, так и гетерологической вирусной инфекции. Это защитное действие ярко выражено в отношении неиммунизированной группы мышей и оно менее заметно, но все же выражено у группы мышей, иммунизированной нормальным мозгом. Нужно обратить внимание на то обстоятельство, что снижение концентрации вирусной взвеси, используемой для заражения животных и снижение смертности не всегда протекают параллельно. Именно поэтому нельзя использовать существующие в настоящее время методы для цифрового выражения степени защиты, предоставляемой этими вакцинами, математически мы их не можем сравнивать. Это же явление мы наблюдаем в отношении пробы на эффективность вакцины от бешенства на мышах (10). В литературе на это явление обратил внимание Хабел (11), пытающийся дать объяснение этого факта.

Проводя пробу по нейтрализации вирусов, мы установили, что и гомологическая сыворотка и сыворотка, полученная от лиц переболевших болезнью в эндемическом районе, хорошо нейтрализуют чехословацкий штамм клещевого энцефалита. Вирус двух венгерских штаммов так же нейтрализуется сывороткой противочехословацкого штамма, но в меньшей степени, чем сывороткой реконвалесцентов, болевших в районе эпидемии.

Между способностью нейтрализовать вирусы двух сывороток, хотя и наблюдается разница по отношению к чехословацкому штамму — причем разница в пользу сыворотки, полученной в районе эпидемии, но эта разница сильнее выражена по отношению к отечественным штаммам. Это обстоятельство указывает на более тесную этиологическую связь между двумя отечественными штаммами и эпидемией. Разница однако настолько незначительная, что можно заключить на очень большое антигенное сходство между венгерскими и чехословацким штаммами.

Эдвардс установил, что чехословацкий штамм близок по антигенным свойствам, как вирусу весенне-летнего энцефалита, так и вирусу *Louping ill* (12). Уже Казалс указал на тесную серологическую и иммунологическую антигенную связь между весенне-летним энцефалитом и *Louping ill* (13, 14). На основании серологического анализа антигенной структуры дальне-восточных и западных и шотландских штаммов (*Louping ill*) Иваненко (15, 16) пришел к выводу, что вирусы шотландского и дальневосточного энцефалитов принадлежат к двум различным штаммам, но что между ними имеются многие переходные формы.

Клинические симптомы у мышей, наблюдаемые нами и описанные выше совершенно совпадают с симптомами, которые описали Зильбер и Захарова (17) в связи с работами по изоляции вирусов из собранных в Белоруссии клещей *Ixodes ricinus*. Точно также их наблюдениям соответствует наше наблюдение, что типичные параличи появляются среди симптомов болезни только после нескольких пассажей. Зильбер и Шубладзе (18) обнаружили при изучении клинической картины болезни у баранов разницу между шотландским вирусом и вирусом весенне-летнего энцефалита. Клиническая картина болезни у баранов, также полностью совпадала с описанной Зильбером, Захаровой и Поповой (19) клинической картиной. Со своей стороны мы хотим еще указать на — если и не выраженный, но все же заметный — двухэтапный характер температурной кривой и то обстоятельство, что столь характерная »вертячка« появляется в конце первого этапа повышения температуры, при ее падении.

Зильбер и его сотрудники (17—20) обнаружили, что изолированный в Белоруссии штамм вируса тождествен с штаммом вируса *Louping ill*. Гращенков, однако, доказательства Зильбера считает недостаточными (21). По мнению Чумакова этиология белорусского и дальне-восточного весенне-летнего энцефалита одна (22). Нужно сказать, что в отношении *Louping ill* принято считать, что хотя эта болезнь уже 150 лет эндемична среди овец Шотландии, в естественных условиях ни один человек ею не заболел. За последние годы с эндемичных областей Шотландии поступили сообщения о нескольких случаев заболеваний, произошедших естественным путем (23, 24, 25), оказавшиеся при лабораторном исследовании *Louping ill*.

Из вышесказанного видно, что точное ограничение вирусов весенне-летнего энцефалита и *Louping-ill* при помощи настоящей лабораторной методики затруднительно и спорно. С целью обоснования различия между этими вирусами приводится различие в клинической картине болезни у людей. Случаи *Louping-ill* описываются как очень легко протекающие, с двухфазной температурной кривой, часто принимаемые за грипп. Такими же описали Глазунов и Попова случаи, бывшие в Белоруссии (26). Весенне-летний энцефалит протекает более тяжело и с точки зрения диференциального диагноза при нем характерным явлением считается атрофия мышц плечевого пояса. У нас наблюдались обе формы болезни (I., 27).

Учитывая вышеприведенные данные, мы склонны принять мнение Чумакова и рассматриваем венгерские штаммы, как вирус весенне-летнего клещевого энцефалита — несмотря на то, что свойства изолированных нами вирусных штаммов и во многом сходны со свойствами белорусских вирусов, которых Зильбер считает вирусами *Louping-ill*. Для разрешения этого вопроса требуется, однако, лабораторное сравнение этих штаммов.

РЕЗЮМЕ

1. Из двух партий, собранных весной 1952 г. 2485 клещей *Ixodes ricinus*, разделенных на 49 групп, удалось внутрицеребральными прививками белым мышам изолировать вирус, вызывающий у подопытных животных энцефаломиэлит.

2. Вирус после внутрицеребрального введения вызывает заболевание молодых и взрослых мышей, хомяков и баранов, но не приводит к заболеванию морских свинок и белых крыс. На третий день после заражения в мозге крысы был обнаружен вирус. Вирус размножается в куриных яйцах и на тканевых культурах.

3. Клинические симптомы на мышах, хомяках: после 4—5 дневного латентного периода раздражительность, тонические судороги, параличи конечностей. У баранов: тремор, расстройства координации, приступы »вертячки«.

4. Патологоанатомически у баранов и у мышей наблюдается дегенеративное изменение в клетках Пуркинье, воспалительно-дегенеративное изменение в сером веществе спинного и головного мозга.

5. Содержащая вирус взвесь, приготовленная из мозга животных заразительна при интрацеребральном, подкожном, внутримышечном, внутривенном, внутрибрюшинном, внутриназальном введениях, а также через рот. После интрацеребрального введения вирус может быть обнаружен в крови, печени, почках, легких, селезенке, надпочечниках мышей. Мы исследовали устойчивость вируса по отношению к температуре.

6. Сыворотка реконвалесцентов, заболевших во время эпидемии менинго-энцефалита в районе сбора клещей, нейтрализует два штамма вирусов, изолированных из клещей.

7. Пробы на перекрестную защиту и на нейтрализацию вирусов показывают, что 2 венгерских штамма, по антигенным свойствам близки чехословацкому штамму клещевого энцефалита.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Fornosi F., Molnár E.:* Orvosi Hetilap. 1952. 93. 993.
2. *Fornosi F., Sz. Gulyás M., Molnár E.:* (печатается).
3. *Olitsky P. K., Casals J.:* J. A. M. A. 1947. 139. 1224.
4. *Molnár E., Fornosi F.:* Orvosi Hetilap 1952. 93. 1032.
5. *Krejci J.:* Presse Médicale, 1949. 74. 1084.

6. *Lépine P.:* C. R. Soc. Biol. 1931. 108. 665.
7. *Burnet F. M.:* J. Path. Bact. 1936. 42. 213.
8. *Шубладзе*, А. К., Гайдамович, С. Я.: Практическая вирусология, Москва, 1949 г. стр. 172.
9. *Rampas J., Gallia F.:* Cas. lék. cesk. 1949. 88. 1179.
10. *Fornosi F.:* Еще не опубликованные данные.
11. *Habel K.:* Publ. Health Rep. 1948. 63. 44.
12. *Edwards D. G.:* Brit. J. exp. Path. 1950. 31. 515.
13. *Casals J., Webster L.:* J. exp. Med. 1944. 79. 45.
14. *Casals J.:* Ibid. 1944. 79. 341.
15. *Иваненко, И. А.:* Советское Мед. Обозр. 1949 г. 3., 6.
16. *Иваненко, И. А.:* Вопросы мед. вирусологии, III., Москва 1950, стр. 176 и 186.
17. *Зильбер, Л. А., Захарова, М. С.:* Вопросы мед. вирусологии, II. 1949 г. стр. 12.
18. *Зильбер, Л., Шубладзе, А. К.:* Zbl. Bakt. Parazit. 1949. 147. 367.
19. *Зильбер, Л. А., Захарова, М. С., Попова Л. М.:* Вопросы мед. вирусологии II. 1949 г. стр. 12.
20. *Зильбер, Л. А., Попова, Л. М.:* Вопросы мед. вирусологии, II. 1949, стр. 27.
21. *Грищенков, Н., Гурвич А. М., Федорчук Л. В.:* Невропат. псих. 1951, 20/2, 36.
22. *Чумаков, М. П.:* Доклад на пражском конгрессе микробиологов, 1949 г. (Из материала венг. мед. документационного центра.)
23. *Davison G., Neubauer Ch., Hurst E. W.:* Lancet, 1948. 2. 453.
24. *Brewis E. G., Neubauer Ch., Hurst E. W.:* Lancet, 1949. 1. 689.
25. *Lawson J. H., Manderson W. G., Hurst, E. W.:* Lancet, 1949. 2, 696.
26. *Глазунов, И. С., Попова, Л. М.:* Вопросы мед. вирусологии, II. 1949. стр. 56.
27. *Gyergyai K., Kamarás J.*, Orvosi Hetilap, 1953. 94. 593.

ZECKENENCEPHALITIS IN UNGARN

F. Fornosi und E. Molnár

ZUSAMMENFASSUNG

In ihren Studien über die Ätiologie der in einem nord-westlichen Teile Ungarns aufgetretenen Meningoencephalitis-Epidemie haben Autoren durch serologische Untersuchungen festgestellt, dass auch in Ungarn mit dem Vorkommen der Zecken-Encephalitis zu rechnen sei. Um dies zu beweisen wurden im Frühjahr 1952 Untersuchungen im epidemischen Gebiet unternommen. Es wurden 2485 Ixodes ricinus L. gesammelt, welche in 49 Gruppen geteilt wurden. Aus zwei Gruppen der Zecken gelang es durch intrazerebrale Impfung an weissen Mäusen das Encephalomyelitis verursachende Virus zu isolieren.

Das intrazerebral geimpfte Virus verursachte bei infantilen und erwachsenen Mäusen, Hamstern und Schafen Erkrankungen; Meerschweinchen und weisse Ratten erkrankten nicht.

Aus dem Gehirn der Ratten war das Virus am dritten Tag nach der Impfung nachweisbar. Das Virus vermehrt sich in bebrüteten Hühnereiern und in Gewebekulturen.

Die klinischen Symptome bestanden bei Mäusen und Hamstern nach einer Inkubation von 4—5 Tagen in Reizbarkeit, tonischen Krämpfen, Extremitätlähmungen; beim Schafe erschienen Tremor, Koordinationsstörungen, »Rotationsanfälle«. Pathologischer Befund: Degeneration der Purkinje-Zellen, entzündliche-degenerative Veränderungen in der grauen Substanz des Rückenmarkes und des Gehirns.

Die virusenthaltende Gehirnsuspension ist sowohl intracerebral, subcutan, intramuskulär, intravenös, intraperitoneal, intranasal geimpft, wie auch per os ansteckungsfähig. Nach intrazerebraler Impfung ist das Virus aus dem Blut, Leber, Niere, Lungen, Milz und Nebennieren der erkrankten Maus nachweisbar. Die Thermoresistenz des Virus wurde auch untersucht. Das Rekonvaleszentenserum der zur Zeit der Meningoencephalitis-Epidemie im Sammelgebiete der Zecken erkrankten Personen neutralisierte die aus Zecken isolierten 2 Virusstämme.

Die 2 einheimischen Stämme zeigen in den Kreuzimmunisierungs- und Virusneutralisationsproben eine enge Antigenverwandtschaft mit dem tschechoslovakischen Zecken-Encephalitis Stamm.

Auf Grund der Literatur wird das Verhältnis des isolierten Virus zu dem Virus der Zecken-Encephalitis und demjenigen der Looping-ill besprochen.

VERSUCHE ÜBER GLEICHZEITIGE ANWENDUNG VON ISONIKOTINSÄURE-HYDRAZID UND ANDEREN GEBRÄUCHLICHEN ANTITUBERKULOSEMITTELN

I. VERSUCHE »IN VITRO«

I. KOCZKA

Institut für Mikrobiologie der Medizinischen Universität, Szeged

Eingegangen am 13. Juli 1953

Die experimentelle Grundlage der gleichzeitigen Anwendung von verschiedenen Tuberkuloseheilmitteln besteht in der Erkenntnis, dass die Kombination dieser Mittel — wenn ihr Angriffspunkt verschieden ist — nicht nur die Hemmwirkung auf die Vermehrung der Bazillen steigert, sondern zugleich auch die Resistenzentwicklung gegenüber bestimmten Heilmitteln ändern kann.

Auf die Bedeutung der Heilmittelkombinationen wurde die Aufmerksamkeit zuerst durch die bei gleichzeitiger Anwendung von Para-aminosalizylsäure (PAS) und Streptomycin entstehende synergetische Wirkung gelenkt [1]. Es wurde auch nachgewiesen, dass eine an sich unwirksame Menge PAS, mit Streptomycin zusammen angewendet, die Entwicklung der Resistenz der Tuberkelbazillen gegenüber Streptomycin hemmt. Das Interesse für Heilmittelkombinationen wurde noch grösser, als bekannt wurde, dass der Tuberkelbazillus sich auch an das sowohl »in vitro« als »in vivo« sehr wirksame neue Mittel, das Isonikotinsäurehydrazid (INH) gewöhnen kann [2].

In der vorliegenden Arbeit wurde »in vitro« untersucht, wie die Vermehrung der Tuberkelbazillen und die Entwicklung der INH-Resistenz durch gleichzeitig in verschiedenen Mengen angewandte PAS, Streptomycin oder Para-amino-benzaldehyd-thiosemicarbazon (Tb_1) beeinflusst wird.

Methodik

Es wurden kristallinische Para-aminosalizylsäure, Streptomycin-kalziumchlorid-komplex, Dihydrostreptomycin-sulfat, Para-azetylamino-benzaldehyd-thiosemicarbazon, Isonikotinsäure-hydrazid-chlorhydrat (Schmelzpunkt 163° C), Isonikotinyl-para-oxy-benzaldehyd-hydrazon (Schmelzpunkt 286° C, Pharmazeutische Forschungsanstalt, Budapest) verwendet. Stammlösungen wurden mit sterilen Geräten und Lösungsmitteln hergestellt und zu jedem Versuch frische Lösungen benutzt.

M/100 PAS-Na-Lösung : 38,25 mg PAS wurden in 15 ml 96%igem Alkohol gelöst und mit 9,5 ml Wasser und 0,5 ml *M*/2 $NaHCO_3$-Lösung versetzt. *M/200*

Tb_1-Lösung : 24 mg Tb_1 wurden in 10 ml 96%igem Alkohol gelöst und mit 10 ml Wasser versetzt. *M/100 Streptomycin-kalziumchlorid-komplex-Lösung :* 73,2 mg Streptomycin-kalziumchlorid-komplex wurden in 10 ml Wasser gelöst. *M/100 Dihydrostreptomycin-sulfat-Lösung :* 73 mg Dihydrostreptomycin-sulfat wurden in 10 ml Wasser gelöst. *M/100 INH-Lösung :* 17,3 mg INH-Chlorhydrat wurden in 10 ml Wasser gelöst. *M/100 Isonikotinyl-para-oxy-benzaldehyd-hydrazon-Lösung :* 24,1 mg wurden in 5 ml 96%igem Alkohol gelöst und 5 ml Wasser hinzugefügt.

Nährböden : Es wurde die von *Dubos* beschriebene Nährlösung benutzt [3]. Der Nährboden enthielt 0,025% Tween 80 (Polyoxyaethylen-sorbitan-monooleat, Atlas Powder Comp. Wilmington, Delaware) und 0,4% Glukose. Als Albuminlösung wurde bei 60—62° C fraktioniertes Rinderserum verwendet [4]. Seine Menge betrug in der Nährlösung 10%. Jede neu hergestellte Albuminfraktion wurde kontrolliert und nur dann benutzt, wenn mit ihr die Fortpflanzung von 10^{-8} mg trockenen Tuberkelbazillen unbehindert einsetzte. Der pH-Wert des Nährbodens war 6,8.

Der feste *Dubos*sche Nährboden unterschied sich von diesem darin, dass er auch noch 1,8% in destilliertem Wasser 24 Stunden lang gereinigten Agar-Agar enthielt.

Verwendete Bakterienstämme : Bei den Versuchen wurden die humanen Tuberkelbazillenstämme $H_{37}Rv$ und 7800 verwendet. Den Stamm $H_{37}Rv$ stellte im Jahre 1951 das Warschauer Institut für Volksgesundheit, den Stamm 7800 das Staatliche Institut für Volksgesundheitswesen (Budapest) zur Verfügung. Seit diesen Zeitpunkten wurden die Stämme auf tweenhaltigem flüssigem Nährboden gehalten. Es wurde beobachtet, dass der ursprünglich Mäusen gegenüber hochgradig virulente (T_{50}* = 19—21 Tage) Stamm $H_{37}Rv$ und der mittelmässig virulente (T_{50} = 24—28 Tage) Stamm 7800 nach 12monatiger Züchtung (bei monatlicher Überimpfung) von ihrer Virulenz einbüssten (beim Stamme $H_{37}Rv$ war T_{50} = 40—50 Tage und bei dem anderen Stamme noch bedeutend mehr). Zum Zeitpunkte der Anschaffung des Stammes $H_{37}Rv$ bildete dieser auf *Dubos*schem Agarnährboden ausschliesslich für die Variante R charakteristische Kolonien. Nach einjähriger Züchtung (in flüssigem *Dubos*schem Nährboden) konnten neben der Variante R auch die Variante S in beträchtlicher Zahl gefunden werden. Der Stamm 7800 wurde nach bedeutendem Nachlassen seiner Virulenz auf *Dubos*schem Agarnährboden untersucht, wobei festgestellt werden konnte, dass seine Kolonien ausschliesslich für S-Varianten charakteristische Merkmale aufweisen. Laut anderen Beobachtungen [5] sind die Tuberkelbazillenkolonien vom Typ S Mäusen gegenüber weniger virulent.

Die Bestimmung des bakteriostatischen Titers : Es wurde mit einer zweifachen Verdünnungsreihe gearbeitet. In die mit Chromsäure gereinigten Jenaer

*Die Zahl der Tage, in denen 50% der mit Tuberkelbazillen infizierten Tiere eingehen.

Reagenzröhren von 180×18 mm wurden 4,4 ml Nährboden und die jeweilige Verdünnung der Heilmittel in 0,5 ml sterilem destiliertem Wasser eingemessen und dann die Bazillensuspension in 0,1 ml Volumen zugesetzt. Als Inoculum dienten 0,1 ml auf *Dubos*schem Nährboden gezüchtete 14tägige Tuberkelbazillen in einer Verdünnung von 1 : 100, was 10^{-4} mg trockenen Tuberkelbazillen entspricht. Bei Heilmittelkombinationen wurde der bakteriostatische Titer in der Weise bestimmt, dass die tuberkulostatische Wirkung von INH bei gegebenen Mengen von Streptomycin, PAS und Tb_1 beobachtet wurde. Die beimpften Reagenzgläser wurden bei 37° C im Thermostat 14 Tage lang inkubiert und dann das Ergebnis festgestellt. Als bakteriostatischer Titer wurde jene kleinste Heilmittelkonzentration bezeichnet, bei welcher nach 14tägiger Beobachtung kein Bakteriumwachstum mit blossem Auge festgestellt werden konnte.

Beobachtung der Resistenzentwicklung : Es wurde fester *Dubos*scher Nährboden verwendet. In Petrischalen wurden auf der Oberfläche von verschiedene Heilmittel enthaltenden festen Nährböden in 10tägigem, flüssigem *Dubos*schem Nährboden gezüchtete Tuberkelbazillenkolonien von 0,2 ml ausgestrichen. Das Trockengewicht der Bazillen schwankte zwischen 0,02—0,03 mg. Die in dieser Weise vorbereiteten Petrischalen wurden 30 Tage lang bei 37° C im Thermostat gehalten. Im Falle von INH war die Heilmittelkonzentration der Nährböden 0,04, 0,08, 0,16 μg/ml ; im Falle von Streptomycin 0,7, 3,5 und 7,0 μg/ml ; im Falle von PAS 0,07 und 0,15 μ/ml ; im Falle von Tb_1 0,24, 0,7 und 2,4 μg/ml. Bei Untersuchungen von Heilmittelkonzentrationen war das eine Heilmittel immer INH. Die Versuche wurden mit Kombinationen von jeweils veränderten Konzentrationen der Mittel unternommen. Es wurden drei verschiedene Verdünnungen von INH verwendet und mit zwei verschiedenen Konzentrationen von PAS kombiniert. Dies führte zu sechs verschiedenen Kombinationen. Auch im Falle von Streptomycin und Tb_1 wurden die Heilmittel — in Gegenwart von INH — in verschiedenen Mengen verwendet. Bei der Kombination dieser letzteren Heilmittel mit INH wurden aber nur je drei Möglichkeiten untersucht.

Untersuchung der bakteriziden Wirkung : Die bakteriziden Eigenschaften von INH, Streptomycin, PAS und Tb_1 wurden in folgender Weise untersucht. Zu 4,4 ml sterilem *Dubos*schem Nährboden wurden je 0,5 ml einer *M*/20000 Streptomycinlösung, *M*/20000 PAS-Lösung, *M*/10000 Tb_1-Lösung bzw. *M*/100000 INH-Lösung zugefügt. Dies bewirkte, dass die Konzentration der Heilmittel im Nährboden das Vierfache des kleinsten Hemmwertes erreichte. Nach der Sterilitätsprobe wurde aus einer 8tägigen Kultur des Stammes $H_{37}Rv$ in jedes Reagenzglas 0,01 ml gegeben, was 10^{-5} mg trockenen Tuberkelbazillen entspricht. 0,1 ml des Inhaltes der gut geschüttelten Reagenzgläser wurde sogleich und nach verschiedenen Zeitspannen mit *Dubos*schem Nährboden auf das Zehnfache verdünnt, wodurch die Heilmittelkonzentration unter den bakteriostatischen Titer gesenkt wurde. Aus der auf diese Weise verdünnten Kultur

wurde 0,1 ml auf *Löwenstein*schen Eiernährboden überimpft und, nachdem die Kulturen 20 Tage lang auf 37,5° C gehalten wurden, das Ergebnis abgelesen.

Ergebnisse

Bakteriostatische und bakterizide Wirkung

Wie aus Tabelle I ersichtlich, hemmten INH, Streptomycin, PAS, Tb_1 und Isonikotinyl-para-oxy-benzaldehyd-hydrazon (IPOH) in starker Verdünnung das Wachstum der ursprünglichen Stämme. Es ist weiter ersichtlich, dass die Heilmittelresistenz der Tuberkelbazillenstämme weitgehend spezifisch ist. Zwischen dem INH und dessen Derivat, dem IPOH kann jedoch eine gekreuzte Resistenz festgestellt werden : die gegenüber INH entwickelte Resistenz macht sich auch gegenüber dem erwähnten Derivat von INH geltend. Das lässt auf die ähnliche Wirkungsweise der beiden Verbindungen folgern.

Tabelle I

Untersuchung der bakteriostatischen Wirkung

Stamm	Empfindlichkeit µg/ml				
	PAS	Tb_1	Streptomycin	INH	IPOH
7800	0,5	0,7	1,0	0,04	0,1
7800·PAS*	16,0	0,7	1,0	0,04	—
7800·Tb_1 **	0,1	23,6	1,0	0,08	0,1
7800·Strept.***	0,5	0,35	16,0	0,04	—
7800·INH****	0,1	0,7	2,0	2,56	12,0
$H_{37}Rv$	0,2	0,7	0,8	0,03	0,1
$H_{37}Rv$·Tb_1**	—	23,6	—	0,03	0,1
$H_{37}Rv$·Strept.***	—	—	16,0	0,03	—
$H_{37}Rv$·INH****	—	0,7	0,8	13,7	13,7

* = an PAS gewöhnter Stamm
** = an Tb_1 gewöhnter Stamm
*** = an Streptomycin gewöhnter Stamm
**** = an INH gewöhnter Stamm
Die Gewöhnung der Tuberkelbazillen wurde in vitro durch kontinuierliche Züchtung und serienmässige Überimpfung in Nährböden durchgeführt, die wachsende Mengen der Heilmittel enthielten.
IPOH = Isonikotinyl-para-oxy-benzaldehyd-hydrazon

Die Zusammenfassung der Ergebnisse der die bakterizide Wirkung der erwähnten Heilmittel betreffenden Versuche ist in Tabelle II enthalten.

Tabelle II

Bakterizide Wirkung der Heilmittel auf den Stamm $H_{37}Rv$

Heilmittel	Konzentration* µg/ml	Dauer der Heilmittelwirkung								
		0**	1	2	3	4	5	7	9	10
Dihydrostreptomycin ...	3,0	4+	***	±	—	—	—	—	—	—
PAS	0,8	4+	2+	2+	+	+	±	±	—	—
Tb_1	2,4	4+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	+
INH	0,13	4+	3+	2+	2+	+	+	+	±	—

*Die angegebenen Konzentrationen der Verbindungen bedeuten das Vierfache des »bakteriostatischen Titers«.

**Die Bakterien waren nur fünf Minuten lang in Berührung mit den Heilmitteln.

***Das Reagenzglas wurde infiziert.

Erklärung: Das Bakterienwachstum auf dem Nährboden wird folgenderweise bezeichnet: — = Tuberkelbazillenkolonien unsichtbar auch bei Lupenvergrösserung; ± = höchstens 5—6 sehr kleine, bei fünffacher Vergrösserung gut sichtbare Kolonien; + = 10—20 grössere oder 30—40 kleinere Bakterienkolonien; 2+ = noch zählbare kleine Tuberkelbazillenkolonien; 3+ = nicht mehr zählbare aber voneinander isolierte Kolonien; 4+ = die Oberfläche des Nährbodens ist reich mit Tuberkelbazillen bewachsen.

Es ist ersichtlich, dass unter den beschriebenen Versuchsverhältnissen die Zahl der lebenden Bakterien mit der Erhöhung der Einwirkungszeit der Heilmittel abgenommen hat. Die Zahl der lebensfähigen Bakterien nahm am raschesten und im grössten Ausmass im Falle von Dihydrostreptomycin und im kleinsten Ausmass im Falle von Tb_1 und INH ab. Obwohl die Versuche nur mit einem Stamme und einer Heilmittelkonzentration vorgenommen wurden, war die bakterizide Wirkung des Streptomycins weit grösser als die der anderen Heilmittel, so dass sie schon unbedingt als charakteristisch bezeichnet werden

Tabelle III

Wirkung von verschiedenen Mengen Streptomycin auf die tuberkulostatische Wirkung von INH Stamm $H_{37}Rv$

Streptomycinkonzentration µg/ml	INH-Konzentration µg/ml				
	0,06	0,03	0,015	0,007	0
0,7	—	—	—	—	—
0,35	—	—	—	+	+
0,17	—	—	—	+	+
0,08	—	—	+	+	+
0,04	—	—	+	+	+
0	—	—	+	+	+

— = mit blossem Auge ist kein Bakterienwachstum zu beobachten.
+ = Bakterienwachstum kann mit blossem Auge beobachtet werden.

kann. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen anderer Forscher [6] überein.

Aus den Untersuchungen über die Heilmittelkombinationen ging hervor, dass Streptomycin, PAS und Tb_1 die tuberkulostatische Wirkung von INH vergrösserten, d. h. dass gleichzeitige Anwendung von an sich wirkungslosen Mengen von INH und diesen Verbindungen die Vermehrung der Tuberkelbazillen hemmte.

Tabelle IV

Wirkung von verschiedenen Mengen PAS auf die tuberkulostatische Wirkung von INH Stamm $H_{37}Rv$

PAS-Konzentration µg/ml	INH-Konzentration µg/ml				
	0,06	0,03	0,015	0,007	0
0,5	—	—	—	—	—
0,25	—	—	—	+	+
0,12	—	—	—	+	+
0,06	—	—	+	+	+
0,03	—	—	+	+	+
0	—	—	+	+	+

— = mit blossem Auge ist kein Bakterienwachstum zu beobachten.
+ = Bakterienwachstum kann mit blossem Auge beobachtet werden.

Tabelle V

Wirkung von verschiedenen Mengen Tb_1 auf die tuberkulostatische Wirkung von INH Stamm $H_{37}Rv$

Tb_1-Konzentration µg/ml	INH-Konzentration µg/ml				
	0,06	0,03	0,015	0,007	0
1,5	—	—	—	—	—
0,75	—	—	—	—	+
0,37	—	—	—	—	+
0,18	—	—	—	+	+
0,09	—	—	+	+	+
0	—	—	+	+	+

— = mit blossem Auge ist kein Bakterienwachstum zu beobachten.
+ = Bakterienwachstum kann mit blossem Auge beobachtet werden.

Wirkung von Heilmittelkombinationen auf die Resistenz gegenüber INH

Im Laufe der Versuche entwickelte der Stamm $H_{37}Rv$ bei einmaliger Berührung mit diesem Heilmittel eine beachtenswerte Resistenz gegenüber INH. Dies ermöglichte die einfache Untersuchung der Wirkung von Strepto-

mycin, PAS und Tb_1 auf die gegenüber INH entwickelte Resistenz. Es wurde beobachtet, dass auf festem Nährboden sich trotz der INH-Konzentration in 30 Tagen Tuberkelbazillenkolonien entwickelten. Die gewählten drei Konzentrationen von INH bedeuteten nämlich unter den Versuchsverhältnissen der Empfindlichkeitsbestimmungen (Inokulation einer zehnfach kleineren Bakterienmenge in flüssigen Nährboden bei 15tägiger Beobachtung) die bakteriostatische Menge bzw. deren zweifachen und vierfachen Wert. Die in Gegenwart grösserer Heilmittelkonzentrationen entwickelten Kolonien enthielten Bazillen, deren Empfindlichkeit gegenüber INH vermindert war. Die Kolonien wurden auf heilmittellosen Nährböden isoliert, wobei ihre Empfindlichkeit gegenüber INH zehnmal kleiner befunden wurde als die ursprüngliche. Die Heilmittelempfindlichkeit der vom dritten Nährboden auf ähnliche Weise gewonnenen Kolonie war unverändert.

Mit Streptomycin, PAS und Tb_1 wurden ähnliche Versuche ausgeführt. Bei diesen Versuchen wurden solche Mengen Streptomycin dem festen Nährboden zugesetzt, dass die gewonnenen Heilmittelkonzentrationen bei den gewöhnlichen Methoden der Empfindlichkeitsbestimmung die bakteriostatische Konzentration bzw. deren fünffachen und zehnfachen Wert bedeutet hätten. Bei allen drei Konzentrationen konnte die Bildung von Kolonien beobachtet werden. Die Empfindlichkeit gegenüber Streptomycin der aus diesen isolierten Stämme wurde mit der hier beschriebenen Methode bestimmt. Nur die bei grösster Heilmittelkonzentration entwickelten Kolonien enthielten teilweise resistente Bazillen, wobei sich die Empfindlichkeit dieser Bazillen gegenüber Streptomycin vierfach vermindert hatte.

Auch im Falle von Tb_1 wurden drei Konzentrationen des Mittels untersucht. Die eine Konzentration erwies sich bei der Empfindlichkeitsfeststellung als bakteriostatisch, die zweite zeigte ein Drittel der Empfindlichkeit der ersten und die dritte das Dreifache. Auf den Nährböden entwickelten sich in allen drei Fällen Tuberkelbazillenkolonien. Die Empfindlichkeit der von isolierten Kolonien gewonnenen Kulturen gegenüber Tb_1 blieb unverändert (0,7 μg/ml).

Bei diesem Versuch wurden sehr niedrige Konzentrationen von PAS untersucht. Diese Heilmittelmengen hemmten die Vermehrung der Tuberkelbazillen selbst unter den beschriebenen Verhältnissen der Empfindlichkeitsfeststellung nicht. Die Empfindlichkeit gegenüber PAS von Stämmen, die aus auf festem Nährboden gezüchteten Kolonien isoliert wurden, blieb unverändert.

Bei den Untersuchungen der Heilmittelkombinationen wurde folgendes beobachtet: die gleichzeitig mit den drei verschiedenen INH-Konzentrationen angewandten beiden PAS-Konzentrationen hemmten nicht nur die Entwicklung von resistenten Stämmen, sondern auch die Vermehrung der Bakterien.

Aus der Kombination der beschriebenen je drei INH- und Streptomycinkonzentrationen können neun verschiedene Heilmittelzusammenstellungen

gebildet werden. Von diesen wurden nur jene drei Fälle untersucht, bei welchen die kleinste, die mittlere und die grösste Menge der beiden Heilmittel gleichzeitig im Nährboden enthalten waren. Auf der Oberfläche des festen Nährbodens konnte nur bei Anwendung der kleinsten Heilmittelmengen die Entwicklung von Kolonien beobachtet werden. Die Empfindlichkeit der aus diesen Kolonien isolierten Stämme hatte sich gegenüber keinem der Mittel geändert.

Die Wirkung von Tb_1 in Gegenwart von INH wurde mit derselben Methode untersucht wie im Falle von Streptomycin. Beide Versuche ergaben übereinstimmende Resultate.

Im Laufe der Untersuchungen wurde des weiteren beobachtet, dass sich die Empfindlichkeit der ersten Subkulturen der in Gegenwart von grösseren Konzentrationen von INH- oder streptomycinresistent gewordenen Bakterien gegenüber dem anderen Mittel wesentlich, ungefähr auf das Vierfache gesteigert hatte.

Diskussion

Der Grad der tuberkulostatischen Wirkung der untersuchten Heilmitteln stimmt im allgemeinen mit anderen Mitteilungen überein [7]. Die beobachteten kleineren Abweichungen können eine Folge der Verschiedenheit der angewandten Methoden sein. Im besonderen wurde vom Verfasser und auch von anderen Forschern beobachtet [8], dass die Zahl der herangezogenen Bakterien, die Dauer des Versuches die Grösse der kleinsten wachstumshemmenden Heilmittelmenge beeinflusst. Die beschriebenen Versuche zeigen, dass von den untersuchten Mitteln in Tween 80 enthaltendem Nährboden bei allgemein verwendetem kleinem Inokulum die tuberkulostatische Wirkung von INH am grössten war. Die antituberkulotische Wirkung der Heilmittel ist eine Funktion der Molekularstruktur, und beim Vergleich der Wirkung von verschiedenen Heilmitteln ist auch ein Vergleich der in Molkonzentration berechneten bakteriostatischen Titer erwünscht. Auf Grund der Molekulargewichte ist die bakteriostatische Wirkung des INH viermal so gross wie jene des Streptomycins und zehnmal so gross wie jene der PAS oder des Tb_1. Aus den Versuchen geht auch hervor, dass die bakterizide Wirkung des Streptomycins grösser ist als jene des INH, der PAS oder des Tb_1.

Die Versuche, bei denen die auf intrazelluläre Tuberkelbazillen ausgeübte Wirkung von Verbindungen untersucht wurde, lieferten wichtige Daten zur Erkenntnis der Wirkungsweise und therapeutischen Brauchbarkeit der erwähnten Heilmittel [9]. Aus diesen Untersuchungen geht hervor, dass das INH leicht die Wände der makrophagen Zellen des Meerschweinchens durchdrang und daher in der gleichen Konzentration das Wachstum der von der Zelle verschlungenen und in *Dubos*schem Nährboden gezüchteten Bazillen

hemmte. Durch ähnliche Versuche wurde auch nachgewiesen, dass die bakteriostatische Wirkung des zusammen mit anderen Mitteln angewandten Streptomycins und der PAS auf intrazelluläre Bazillen wesentlich abnimmt.

Die Verschiedenheit der Wirkungsweise, der Permeabilität und der Resistenz zustande bringenden Eigenschaften des bakteriostatischen Titers der Antituberkulotika weist auf die Möglichkeit hin, dass Heilmittelkombinationen gefunden werden können, deren therapeutische Eigenschaften vorteilhafter sind als jene der einzelnen Heilmittel allein. Die Untersuchung der Heilmittelkombinationen kann also zu therapeutisch verwertbaren Ergebnissen führen.

Die Wirkung der Kombination von INH und Streptomycin auf Tuberkelbazillen wurde auch schon von anderen Forschern untersucht. Die Steigerung [10], Summierung [11] der Wirkung der Heilmittel so wie ihre gänzliche Indifferenz [12] wurden schon beschrieben. In den angeführten Versuchen wurde die Summierung der Wirkung der beiden Heilmittel beobachtet. Das Ergebnis dieser Versuche steht im Einklang mit jenen Untersuchungen, welche auf die verschiedene Wirkungsweise der Mittel hinwiesen. Andererseits bleibt laut einer früheren Mitteilung des Verfassers [13] die Annahme bestreitbar, dass eine zwischen den beiden Verbindungen zustande kommende chemische Reaktion den Wirkungsgrad herabsetzt. In diesem Falle müsste nämlich zwischen dem INH und dem Streptomycin eine Reaktion zustande kommen, deren Produkt eine Verbindung mit kleinerer tuberkulostatischer Wirkung wäre, als jene des Streptomycins oder des INH. Nach neueren Literaturangaben [14] ist die tuberkulostatische Wirkung der Molverbindung des INH und des Streptomycins — des Streptomycin-isonikotinyl-hydrazons — grösser, als von der im Molekül enthaltenen Streptomycin- oder INH-Menge zu erwarten wäre. Da Streptomycin-isonikotinyl-hydrazon in einer wässerigen Lösung von 1 mg% oder noch grösserer Verdünnung nahezu vollständig in seine Bestandteile, in Streptomycin und INH zerfällt, wurde von den Autoren bei der Untersuchung von niedrigen Konzentrationen der Molverbindung die Wirkung der Mischung der beiden Mittel festgestellt. Es wurde daher im Einklang mit dem Ergebnis der Beobachtungen die Summierung der Wirkung der beiden Mittel beschrieben.

Die experimentellen und klinischen Ergebnisse bezüglich des tuberkulostatischen Wertes der INH-PAS-Kombination bestätigten übereinstimmend die additionelle Wirkung der beiden Heilmittel [12, 15].

Die Untersuchung der Kombinationen des INH, und in noch grösserem Masse des IPOH und Tb_1, kann eher von theoretischem Gesichtspunkt auf Interesse rechnen, weil aus der ähnlichen chemischen Struktur der Verbindungen auf eine ähnliche Wirkungsweise gefolgert werden kann. Es ist bekannt, dass Verbindungen mit ähnlicher Wirkungsweise eine gekreuzte Resistenz aufweisen [16]. Es ist jedoch keine Ähnlichkeit in der chemischen Struktur nötig, um zwischen den beiden Verbindungen eine gekreuzte Resistenz hervorzubringen. Es wurde aber auch beobachtet, dass die Intensität der gekreuzten

Resistenz mit der chemischen Struktur der untersuchten Verbindungen im Zusammenhang steht [17].

In den hier beschriebenen Experimenten wiesen INH und IPOH eine gekreuzte Resistenz auf, woraus auf die Übereinstimmung ihrer Wirkungsweise geschlossen werden kann. Dagegen erwies sich die Wirkungsweise des Tb_1 und der erwähnten beiden Verbindungen trotz der scheinbaren Ähnlichkeit ihrer chemischen Struktur als verschieden. Diese Beobachtung weist auf die wichtige Rolle des Schwefelatoms des Tb_1-Moleküls in der antituberkulotischen Wirkung hin.

Es ist bemerkenswert, dass die Entwicklung der Resistenz der Tuberkelbazillen gegenüber INH mit einer ganz geringen Menge PAS verhindert werden kann. Es wurde in der Literatur schon früher beschrieben [18], dass PAS die Entwicklung der Streptomycinresistenz verhindert. Diese Beobachtung und die Tatsache, dass gegenüber PAS in vitro keine Resistenz hervorzurufen war [19], stehen miteinander in Einklang. Obzwar im Laufe der hier beschriebenen Versuche bei einzelnen Stämmen die PAS-Resistenz gesteigert [20] und die Abnahme der Empfindlichkeit gegenüber PAS auch von anderen Forschern bei der Krankenbehandlung nachgewiesen werden konnte [21], kann festgestellt werden, dass die Resistenz der Tuberkelbazillen gegenüber PAS sehr selten vorkommt. Wahrscheinlich ist dies die Erklärung dafür, dass die gegenüber anderen Mitteln — so z. B. gegenüber INH — oft vorkommende Entwicklung der Resistenz durch PAS gehemmt werden kann.

Die Empfindlichkeitsverminderung der Tuberkelbazillen gegenüber Streptomycin kann nicht nur in vitro leicht hervorgerufen werden, sondern ist auch in vivo eine häufige Erscheinung.

Die Kombination von INH mit Streptomycin scheint also vom Gesichtspunkt der Resistenzentwicklung wenig vorteilhaft zu sein, weil mit Resistenz gegenüber beiden Mitteln gerechnet werden kann. Auch in den hier beschriebenen Fällen wurden in vitro mit aufeinanderfolgender Gewöhnung gegenüber INH und Streptomycin gleicherweise resistente Bazillen gewonnen, neuerdings wurden aber auch anderwärts durch gleichzeitige Anwendung der beiden Mittel in niedriger Konzentration ähnliche Stämme gezüchtet [14]. Obwohl die Ausbildung der gleichzeitigen Resistenz gegenüber beiden Mitteln wesentlich schwieriger ist, als gegenüber einzelnen Mitteln, so verdient diese Beobachtung vor allem vom therapeutischen Gesichtspunkt dennoch Beachtung. Bei den angeführten Versuchen wurde beobachtet, dass das Streptomycin im Vergleich zur PAS die Entwicklung der Resistenz gegenüber INH des Stammes $H_{37}Rv$ bei wesentlich grösserer Konzentration hemmte. Diese Beobachtung geht auch aus den Untersuchungen anderer Autoren hervor [12].

Es wurde beschrieben, dass die Empfindlichkeit der ersten Subkultur der gegenüber Streptomycin oder INH resistent gewordenen Stammes gegenüber dem anderen Mittel grösser geworden war. *Tschertkowa* [22] beobachtete die

Abnahme der Lebensfähigkeit von Tuberkelbazillen, die von mit anderen Heilmitteln behandelten Kranken isoliert wurden und bezeichnet als eine der Ursachen dieser Erscheinung die bakterienschädigende Wirkung des Heilmittels. Die vom Verfasser ausgeführten Versuche ergeben eine weitere Bestätigung für die Richtigkeit dieser Feststellung.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die tuberkulostatische Wirkung von INH, Streptomycin, PAS und Isonikotinyl-para-oxy-benzaldehyd-hydrazon verglichen. Am grössten war die Wirkung von INH. Die Wirkungsweisen von INH und seines Derivats, des Isonikotinyl-para-oxy-benzaldehyd-hydrazons sind einander ähnlich, während die Wirkungsweisen der anderen Mittel verschieden sind. Die entschiedenste bakterizide Wirkung wies das Streptomycin auf. Bei alleiniger Anwendung von INH entwickelten sich auf festem Nährboden öfters resistente Kolonien. Unter ähnlichen Bedingungen verhinderten verhältnismässig kleine Mengen von Streptomycin, PAS und Tb_1 die Entwicklung der Resistenz gegenüber INH. Die Heilmittelkombinationen INH—PAS, INH—Streptomycin und INH—Tb_1 wiesen eine gesteigerte bakteriostatische Wirkung auf.

LITERATUR

1. *Youmans, G. P., Youmans, A. S., Osborne, R. R.:* Lancet **67**, 403 (1947). *Vennesland, R., Ebert, R. H., Bloch, R. G.:* Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. **68**, 250 (1948). *Graessle, O. E., Pietrovski, J. J.:* J. Bact. **57**, 459 (1949).
2. *Steenken, W., Jr., Meade, G. M., Wolinsky, E.:* Am. Rev. Tuberc. **65**, 754.
3. *Dubos, R. J., Davos, B. D.:* J. Exp.-Med. **83**, 409 (1946).
4. *Dubos, R. J., Middlebrook, G.:* Am. Rev. Tuberc. **56**. 334 (1947).
5. *McKee, C. M., Rake, G., Donovick, R., Jambor, W. P.:* Am. Rev. Tuberc. **60**, 90 (1949).
6. *Garrod, L. P.:* Am. Rev. Tuberc. **62**, 582 (1950).
7. *Mackaness, G. B., Smith, N.:* Am. Rev. Tuberc. **66**, 125 (1952).
8. *Knox, R., King, M. B., Woodroffe, R. C.:* Lancet 854 (1952).
9. *Mackaness, G. B.:* Jour. Path. Bact. **64**, 429 (1952).
10. *Ilavsky, J.:* Am. Rev. Tuberc. **65**, 777 (1952).
11. *Pausy, F., Stander, H., Donovick, R.:* Am. Rev. Tuberc. **65**, 754 (1952). *Rist, N., Grumbach, F.:* Rev. de la Tbc., Sér. 5. **16**, 665 (1953).
12. *Kovács, F., Eidus, L., Lányi, M.:* Orvosi Hetilap **94**, 225 (1953).
13. *Koczka, I.:* Orvosi Hetilap **93**, 1276 (1952).
14. *Hobby, G. L., Lenert, T. F., Rivoire, Z. C., Donilian, M., Pikula, D.:* Am. Rev. Tuberc. **67**, 808 (1953).
15. *Koczka, I.:* Orvosi Hetilap **94**, 123 (1953). *Goulding, R., Robson, J. M.:* Lancet 849 (1952).
16. *Work, S., Work, E.:* The Basis of Chemotherapy. London (1948).
17. *Гаузе, Г. Ф.:* Успехи Современной Биологии **34**, 354 (1952).
18. *Williston, E. H., Youmans, G. P.:* Am. Rev. Tuberc. **62**, 156 (1950).
19. *Hurni, H.:* Experientia **5**, 128 (1949). *Graessle, O. E., Pietrovski, J. J.:* J. Bact. **57**, 459 (1949).
20. *Iványics, G.:* Experientia **6**, 108 (1950).
21. *Delaude, A., Karlson, A. G., Carr, D. T., Feldmann, W. H., Pfuetze, K. H.:* Proc. Staff. Meet. Mayo Clin. **24**, 341 (1949).
22. *Черткова, Е. Л.:* Пробл. Туберк., **4, 68** (1950).

ОПЫТЫ ПО СОВМЕСТНОМУ ПРИМЕНЕНИЮ ГИДРАЗИДА ИЗОНИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ (INH) С ДРУГИМИ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫМИ СРЕДСТВАМИ

I. Опыты в пробирках

И. Коцка

Резюме

Среди противотуберкулезных средств, которые применяются в настоящее время, как гидразид никотиновой кислоты (INH), стрептомицин, пара-аминосалициловая кислота (PAS), пара-ацетиламинобензалдегид-тиосемикарбазон (Tb_1) и изоникотинил-пара-окси-бензалдегид-гидразон (IPOH), самое большое туберкулостатическое действие имеет INH. Между INH и IPOH можно отметить перекрестную резистентность, потому что IPOH не действует на резистентные по отношению INH штаммы. Вероятно, оба эти соединения имеют тождественное действие. Полученная in vitro резистентность туберкулезных палочек в отношении остальных лекарственных веществ специфическая.

Из перечисленных выше соединений самое выраженное бактерицидное действие в условиях опыта имеет стрептомицин.

Во время наших опытов почти во всех случаях удалось выделить резистентные в отношении INH штаммы, вследствие контакта бактерии с INH. Не происходит образование резистентных колоний, т. е. не происходит размножение бактерий, если питательная среда содержит одновременно с INH, столько же PAS, стрептомицина, или Tb_1, сколько само по себе не может оказать действие на размножение бактерий. Очень маленькое количество PAS уже достаточно для торможения возникновения резистентных в отношении INH штаммов.

Бактериостатическое действие комбинированных лекарств INH—PAS, INH — стрептомицин и INH—Tb_1 суммируется из действий отдельных компонентов. Во время опытов не удалось отметить размножение бактерии даже и в тех пробирках, в которые прибавили оба лекарственные вещества, в недействующих в отдельности количествах.

A PURIFIED PRECIPITATED VIRUS OBTAINED BY A NEW, SIMPLE METHOD

II.

By

GY. TAKÁTSY

State Institute for Public Health, Budapest

Received July 15, 1953

The method reported in part I. of this series [1] is based on the fact that influenza, mumps and ND viruses purified by the red cell adsorption and elution method become precipitated on dialysation against distilled water or hypotonic salt solution and can be centrifuged off in a common laboratory centrifuge. Precipitation is connected with the reduction of salt concentration. With each strain of virus there is an optimal concentration at which complete precipitation of the particular strain occurs, without any loss in biological properties. The precipitated virus can be brought into solution with saline and thus very high virus concentrations can be obtained. The purity of such preparations, as estimated on basis of N determinations carried out in different phases of the concentration, is equivalent to those obtainable with the most efficient methods of purification. In studies on various strains of influenza virus it has been found that the A and A-prime strains are precipitated at a higher (0,3 per cent), and the B strains at a lower (0,1 per cent) salt concentration.

In the present paper further physico-chemical studies on the conditions of precipitation, as well as ultracentrifugal, electron microscopic and serological experiments carried out with the virus preparation are reported.

Materials and methods

Virus strains. PR8, Paris PL 1/49, Sweden 3/50, Budapest 7/51 (2), England 1/51 (Liver pool) and LEE were used.

The strains were cultured and infectivity titrations carried out by methods similar to those reported in part I. of the present series. The chicken red cell suspensions used in haemagglutination studies were prepared by the method described in the same paper.

Immune sera were obtained from eight to ten weeks old chicken. Immunization was carried out by injecting intravenously twice, at five-day intervals one ml of the allantoic fluid infected with the virus. The chicken were sacrificed by bleeding on the tenth day after the first inoculation.

Haemagglutination tests were carried out on grooved plexiglass plates, employing the spiral loop (3, 4).

Nitrogen was determined with the micro-*Kjeldahl* method, as modified by *Schulek* (5).

The procedures employed in ultracentrifugal and electron-micrographical studies are discussed in the corresponding sections.

Physico-chemical examinations

Experiments were made to determine whether precipitation occurs also when the salt concentration was reduced by means of diluting with distilled water, instead of using the dialysis method.

Paris PL 1/49 strain of influenza virus was used. In one series the red cell eluates were dialysed against 0,2 per cent NaCl at 4° C for 18 hours, while in another series such volumes of neutral distilled water were added to the eluates as to reduce the salt concentration to 0,2 per cent. The latter mixture was kept at 4° C for one hour, then both materials were centrifuged at 3000 r. p. m. for 20 minutes. The supernatants were stored for further examinations, the sediment was taken up in saline and re-centrifuged at 3000 r. p. m. for 10 minutes. The purified and concentrated virus remained in the supernatant. The haemagglutination titers and pH of the viral preparation and those of the supernatants were determined and their infectivity was titrated in embryonated eggs. The results are shown in Table I.

Table I

Precipitation and concentration of virus by the dialysis and by the distilled water dilution methods

		Volume ml	HA titre	pH	x initial concentration	Egg infective titre
Red cell eluate		100	12.800	6.9	10	$10^{-9.5}$
Supernatant	after dialysis ...	50	600	6.9	—	—
Supernatant	After dilution with distilled water ..	100 (25)	150	6.9	—	—
Concentrate	Dialysis	2	200.000	7.0	250	$10^{-10.0}$
Concentrate	Dilution	1	256.000	6.9	250	$10^{-10.3}$

According to the data of Table I, the virus is precipitated also when the concentration of the salt solution has been reduced by means of diluting with distilled water. In connection with the precipitation, no significant change in the pH occurs and viral haemagglutination and infectivity show no marked reduction.

Next the role of H^+ concentration in the process of precipitation was studied. Red cell eluates of the Paris and of the LEE virus were used. To 0,3 ml of eluate 0,6 ml of saline was added in one series, in another series an equal

volume of distilled water. In the latter series the concentration of NaCl was thus made to decrease to 0,3 per cent. Then in each series the pH was adjusted to between 8,0 and 5,5, under the control of the »Hellige« universal indicator. In order to avoid major alterations in salt concentration, instead of a buffer minimal amounts of N/10 HCl and N/10 NaOH were used for adjusting the pH. The materials were centrifuged and the sediment resuspended in 0,9 ml of saline. The haemagglutination titres of the supernatant and the sediment were estimated. The results are shown in Table II.

Table II

Precipitation of influenza virus at different pH

pH	Eluate diluted with saline				Eluate diluted with dist. water			
	Paris		LEE		Paris		LEE	
	supernatant	sediment	supernatant	sediment	supernatant	sediment	supernatant	sediment
8,0	1200	50	1500	50	100	1200	1000	400
7,5	1200	50	1500	50	100	1200	1200	400
7,0	1500	50	1500	80	80	1200	1200	600
6,5	1000	20	1200	30	50	1000	600	500
6,0	800	20	800	20	5	400	300	300
5,5	5	0	80	0	0	0	0	30

The values given in Table II originate from parallel titrations and are interpolated and rounded off. It can be seen in the Table that in an acid medium the virus gradually loses its haemagglutinating capacity. Precipitation is observed only at a reduced salt concentration, while under the experimental conditions specified the pH plays no significant role in precipitation. It can also be seen from the Table that in agreement with an earlier statement made by us, at the 0,3 per cent salt concentration employed in the experiment, a definite difference presents itself between the Paris and LEE strains, inasmuch as the aggregation of Paris virus belonging to the A-prime group is nearly complete, while that of the B-group LEE virus is only partial.

In the next experiment the degree of influenza virus aggregation after the reduction of the salt concentration in media containing different ions was studied. The phosphate buffer, the various Na and K salts, as well as the chlorides of alcaline earth metals (Ba, Ca, Mg) seemed the most interesting. Allantoic fluid from eggs infected with Paris virus were brought together by the usual method with chicken red cells and elution was carried out in 1 per cent solutions of each of the above salts. The salts were employed in percentual solutions and not in molar ones in order to facilitate comparison with our previous results. The virus was eluted in a similar degree in each of the salt solutions, as indicated

by the substantially identical HA titres. Then in each of the samples the salt concentration was lowered to 0,3, 0,2 and 0,1 per cent, respectively, by means of diluting with distilled water. The substances were kept at 4° C for 15 minutes, then centrifuged at 3000 r. p. m. for 30 minutes. The virus content of the supernatants and that of the precipitates were estimated by the haemagglutination method. The results are shown in Fig. 1, in percentiles of virus precipitated.

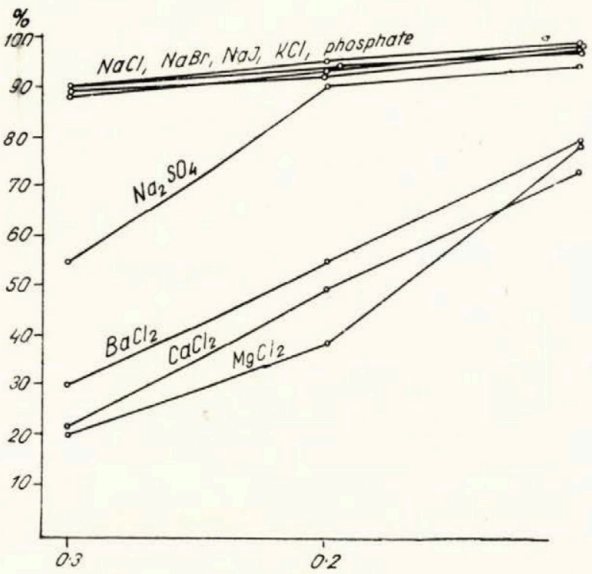


Fig. 1. Precipitation of influenza virus on reduction of salt concentration in media containing different ions. Abscissa, salt concentration. Ordinate, precipitation, per cent

Figure 1 shows that precipitation of virus occurs very similarly in media containing different Na and K salts, as well as a phosphate buffer. Only Na sulphate media are somewhat different in this respect, at a 0,3 per cent concentration. In Ba, Ca and Mg chloride media viral aggregation is uniformly less marked.

In order to present a few data relative to the purity of the preparations used, we have determined the N content and HA titre of a few preparations and show their HA values per 1 mg N/ml and those per 1 mg of solids in terms of log titres in Table III.

Ultracentrifugal experiments

The Svedberg »Equilibrium« centrifuge was used. The sedimentation constant of the influenza virus was estimated by the light absorption and *Lamm*'s scale methods. Densitograms were made of the light absorption pictures

Table III

Purity of different preparations of influenza virus

Material	mg N/ml	mg of dry substance/ml	log HA	log $\frac{HA}{mgN/ml}$	log $\frac{HA}{mg\ d.s./ml}$
PR8 conc (dialys)	0,347	5,0	5,5	6,0	4,8
Paris conc. (dialys)	0,522	6,8	5,3	5,6	4,5
Paris conc. (dilution)	0,470	6,3	5,4	5,7	4,6

by means of *Cieleszky* and *Sándi*'s [6] automatic recording microphotometer combined with a polarograph. On the waves showing the sedimentation boundaries the inflexion point of the »half wave« has been taken for the site of the sedimentation zone, according to the conventions employed in the evaluation

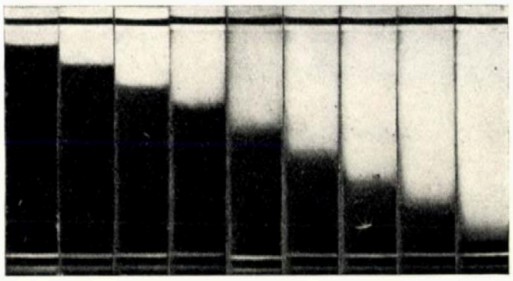


Fig. 2. Sedimentation of purified and concentrated influenza virus. Light absorption photograph (12.000 r. p. m. Interval between exposures, 5 min.)

of polarograms. Although that point is not identical with the site of the 50 per cent concentration, it is still within the limits of error of sedimentation analysis. An advantage of the method, on the other hand, is the fact that there is no need for plotting a separate concentration curve.

In Fig. 2 a series of light absorption photographs of our Paris virus preparation is shown. The densitogram of a slit photograph is presented in Fig. 3.

In sedimentation experiments carried out with the England 1/51 strain the mean of the sedimentation constant as calculated on the basis of light absorption photograph was $S^{\circ}_{20}=784$. The limit of error was $\pm$ 6 per cent, that is not much above the $\pm$ 4 per cent limit of *Lamm*'s [7] scale method. This S value is somewhat higher than the value of 742 given in the literature [8] for the PR8 strain. In our experiments with PR8 virus the value of S, averaging 751, closely approached the above figure.

In experiments employing *Lamm*'s scale method it was endeavoured to find out whether the modification of the *Lamm* curve reported by *Gard* et al. [7] and ascribed to the presence of incomplete virus would be present in our

cases. Evidence obtained in this series confirmed the findings of *Gard* et al. inasmuch as the ascending branch of each of the curves showed a break, with

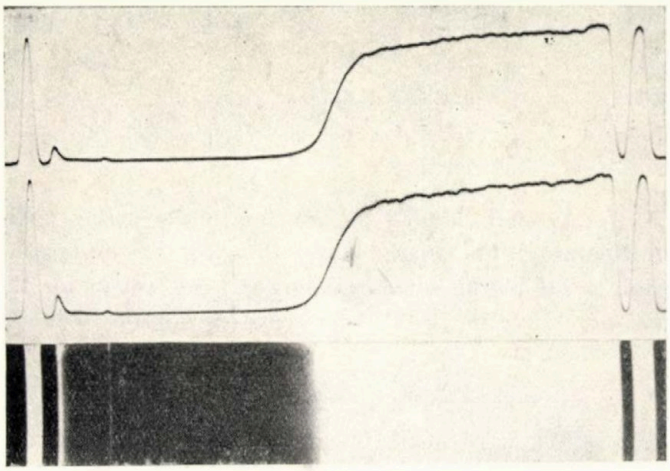


Fig. 3. Densitogram of a slit photograph

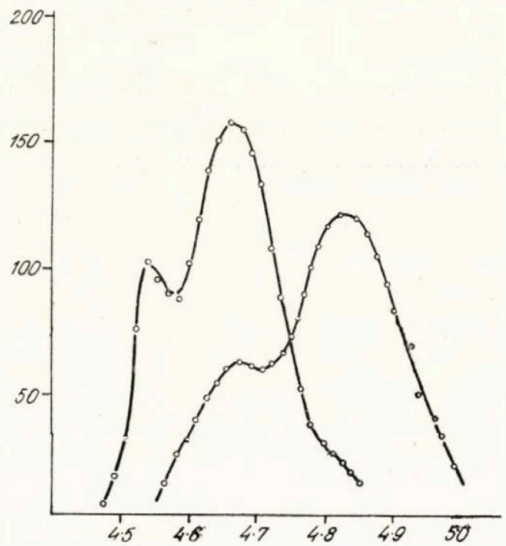


Fig. 4. Modification of the *Lamm* curve brought about by incomplete virus. Abscissa, distance, from the axis. 12,000 r. p. m. Interval between exposures, 5 min. Ordinate, scale displacement

a definitely double-peaked curve in one of the cases. The S value calculated on the basis of the lower peak corresponded with that described by *Gard* et al., suggested to be characteristic of S values for incomplete virus. In Fig. 4, *Lamm*

curves for our virus preparation are shown. The mentioned modification can be clearly seen on the curves.

It is known that the value of S depends on the concentration of the substance. This has been especially emphasized by *Gard* et al. for influenza virus and this is why S values are usually extrapolated to infinite dilutions. To elucidate this point, ultracentrifugal studies have been conducted with different concentrations of our viral preparation. It was striking that in no case could a significant change in the S value be obtained by altering the concentration. The probable causes underlying this fact will be dealt with in the Discussion.

Electron microscopical examinations

The electron micrographs were made in the Electron Microscopical Laboratory of the Hungarian Academy of Sciences. A Swiss made TTC electron microscope was used.

Fig. 5. Electron micrographic appearance of concentrated and purified influenza virus. Magnification 11,000× Gold shading

Technique of preparation I. The excess of a micro-drop carried on to a collodium membrane was re-absorbed with a twisted thread of cotton and after drying the preparation was submerged in distilled water in order to eliminate salts. To facilitate more rapid drying the excess of water was absorbed by blotting. Gold shading was used.

Technique of preparation II. The micro-drop carried on to a collodium membrane together with the object screen were placed in a vacuum chamber cooled by CO_2 and dried from the frozen state [9].

An electron micrograph of the concentrated virus preparation prepared according to technique I is shown in Fig. 5.

The purity of preparation allowed counting of particles with satisfactory accuracy. Various dilutions of Paris virus were carried on to the screen, taking care that everywhere the micro-drops should cover equal areas of about 2 square mm. The excess of fluid was drawn off by means of a small glass capillary. The amount of viral suspension remaining on the screen was estimated by carrying onto the screen a concentrated solution of fluoresceine, using a similar preparation technique. After drying, the screen was submerged into a known volume of distilled water and the amount of fluoresceine solution carried on to the screen was estimated from the discolouration of the water by means of colorimetric comparison to a standard solution. Experimental results relative to particle counts are shown in Table IV.

Table IV

Correlation between haemagglutination and number of particles

HA titer	Number of particles per 1 square micron	No of particles for 1 HA unit per ml
9.600	26	$5.4.10^7$
4.800	12	$5.0.10^7$
2.400	7	$5.8.10^7$

It can be seen that the haemagglutination titre runs parallel with the number of particles per square micron. With known amounts of substance carried on to the screen and knowing the area covered, it becomes possible to calculate the number of particles for one haemagglutination unit per one ml. In different dilutions of the preparation approximately identical values (5.10^7) have been obtained.

Subsequently, the precipitation of virus resulting from the reduction of salt concentration has been subjected to electron microscopy. In order to avoid aggregation and destruction of the particles during preparation, technique II was employed. Aggregation of viral particles could be clearly demonstrated in the electron micrographs. No precipitation of other proteins occurred (Fig. 6).

Electron micrographic studies on the morphology of different strains of influenza virus supplied evidence indicating that the appearance of the filamentous form in the preparations can be considered a strain characteristic.

Fig. 6. Aggregation of virus on reducing the salt concentration. Magnification, 12 500×
Gold shading

Fig. 7. Filamentous form of influenza virus (Sweden 3/50 strain). Magnification, 12 500×
Gold shading

Thus, e. g. in preparations of Sweden 3/50 and of Budapest 7/51 strains, a greater or smaller number of filamentous forms was always present (Fig. 7), while other strains (PR8, Paris PL 1/49, LEE) exhibited no such forms.

The electron micrographic appearance of concentrated and purified virus

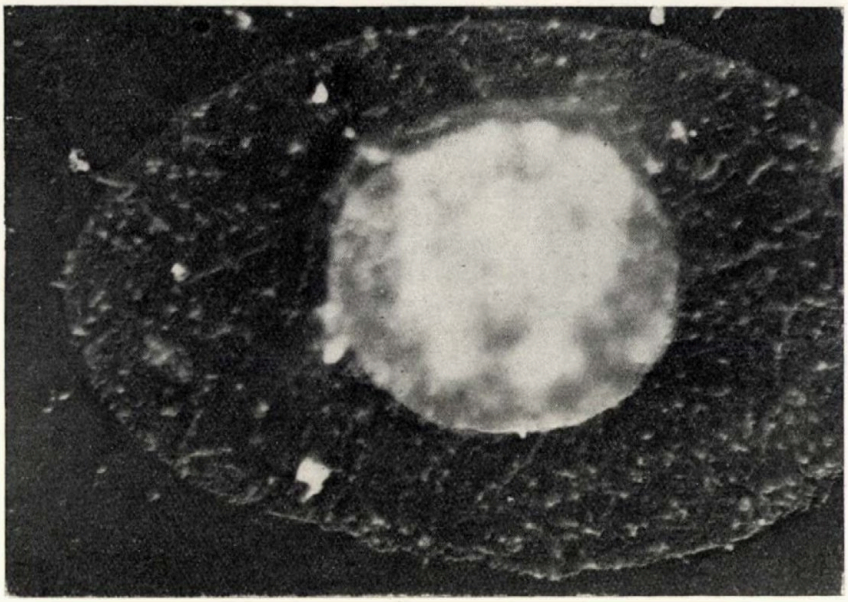


Fig. 8. Influenza virus adsorbed onto chicken red cell stroma. Magnification, 9 400 × Gold shading.

adsorbed onto the stroma of a chicken red cell is shown in Fig. 8. Preparation was made according to *Dawson* and *Elford* [10].

Serological examinations

The concentrated viral preparations obtained by the simple method were used chiefly in antibody absorption tests. These studies will be reported in another paper [11]. At present we shall deal only with the specific slide agglutination which occurs when the viral preparation is brought together with immune serum. It has been found namely that when the concentrated viral preparation is added to immune serum, a phenomenon visible to the naked eye and similar to the slide agglutination used in bacteriology appears. This reaction is specific, since it can be brought about only with homologous or closely related strains, as it is demonstrated in Fig. 9 a, b, c. Our remarks to this point will be made below.

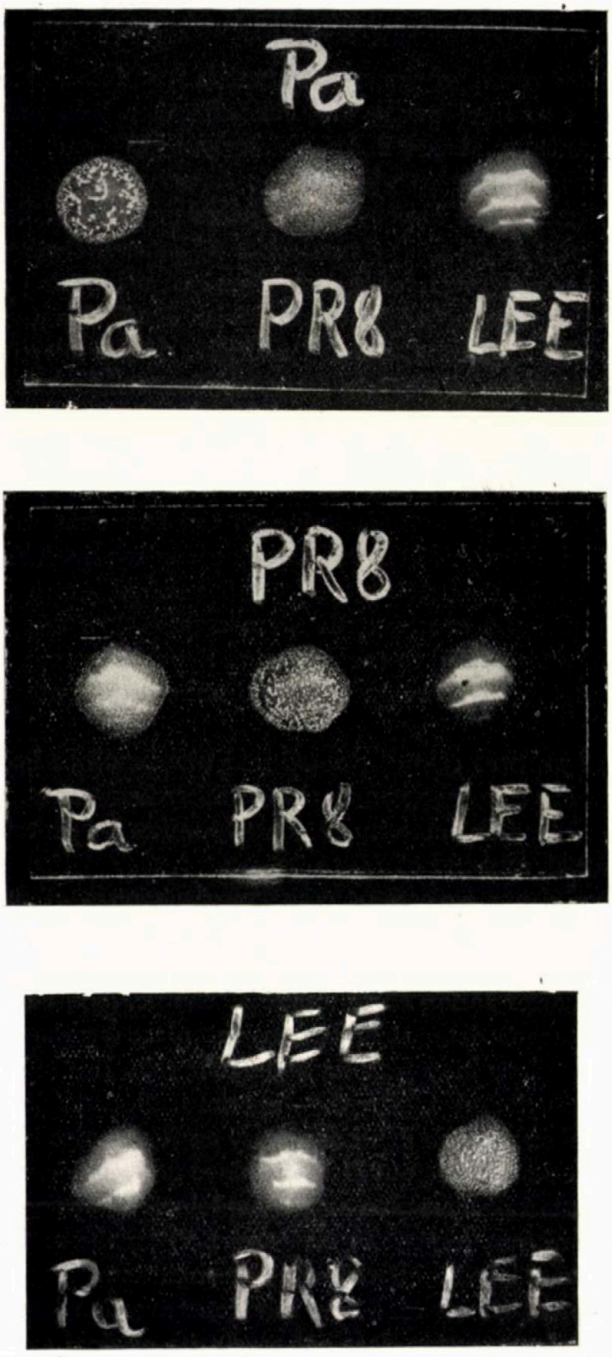


Fig. 9. Specific slide agglutination carried out with concentrated viral preparation. (On slides, above, viral preparation ; below, immune serum)

Discussion

The practical result of the experiments is a simple method of obtaining viral preparations of high purity and concentration. The starting point was the basic phenomenon observed by *Yeremyeyev* [12] and, independently of him, also by us, according to which under certain conditions influenza virus becomes precipitated from hypotonic salt solutions. In addition to the statements made in part I. of the present series of papers, further investigations have shown that precipitation of the virus occurs on lowering the salt concentration if this has been reached by dilution with distilled water instead of dialysis. It is, however, to be noted that the degree of precipitation is influenced also by the concentration of virus. In dilute viral suspensions on further dilution with distilled water, although an observable aggregation of virus particles occurs, this does not reach the degree required for sedimenting in an usual laboratory centrifuge. It is particularly the B strains which can be concentrated with less efficacy by this method, owing to the fact that with these strains an about eightfold dilution of the red cell eluate is required. A strains, on the other hand, are efficiently precipitated by this method that has the advantage of being more rapid and consequently more aseptic than dialysis and exposes the virus for a shorter period to the damaging hypotonic state. From the precipitated and re-dissolved viral suspension the virus precipitates readily on addition of distilled water.

The role of pH was also elucidated and was found to be negligible from the point of view of virus aggregation. On the other hand, to avoid as well a loss in viral haemagglutinating activity as contamination by protein, precipitation must be carried out at a pH of 7,0 to 7,2.

From experiments concerning with the mechanism of precipitation the following conclusions can be drawn. It is known that the stability of suspension or colloidal solution is greatly influenced by the charge of particles. Particles easily precipitate after losing their electrical charge. The charge of particles of amphoteric nature is determined in the first place by the concentration of H^+ ions. Also other ions may play an important role. In the case of the virus aggregation described and under the experimental conditions specified the lability of the viral suspension depends chiefly on the change in the salt concentration while the concentration of H^+ ions plays no significant role in this respect. The aggregation phenomenon can be explained by some change occurring in the adsorption of ions (especially Na^+ and K^+) on the surface of viral particles, in consequence of the altered salt concentration.

The virus precipitated at a low salt concentration can be »dissolved« again, but the viral suspension does not regain its original stability. The viral particles in our preparation showed a tendency to aggregate, as it was frequently observed in ultracentrifugal and electron microscopical examinations. This ten-

dency may account also for the specific agglutination induced by immune sera in our preparation. This phenomenon has not been mentioned in the literature in connection with influenza virus because it cannot be brought about with stable viral preparations produced by other (e. g. ultracentrifugal) methods. The absence of a reduction of the sedimentation constant on increasing the concentration was probably due to the lability of our suspensions. The greater tendency to aggregate at higher concentrations acted compensatorily on the reduction of the sedimentation constant.

In electron microscopical studies a number of micrographs have testified to the purity of our different viral preparations. It could be also determined to what an extent the picture depends upon the technique of preparation employed. Particularly in preparations containing salt, the viral particles may undergo variations in shape, size and aggregation when a large drop is carried on to the screen and drying is slow. With a careful preparation technique, on the other hand, the viral particles may be so evenly distributed that it was possible to estimate their number with sufficient accuracy.

The specific agglutination producible in our viral preparation by mixing with homologous immune serum is fully analogous with bacterial agglutination, inasmuch as viral particles also aggregate with higher dilutions of immune serum and the clumps visible to the naked eye or with a magnifying glass can be considered as conglomerates of viral particles. Consequently the phenomenon is not identical with the precipitation phenomena described by *Jensen and Francis* [13] and *Knight* [14]. Still, the mechanism of agglutination is influenced by other factors beside those mentioned, e. g. by so far unexamined substances present in the sera of various animal species. Agglutination could be brought about namely best with chicken and pig immune sera, less with ferret and human sera, while the hamster immune serum did not give the reaction at all.

SUMMARY

(i) Influenza virus previously purified by the red cell adsorption and elution method is precipitated on lowering the salt concentration also when this is attained not by dialysis but by dilution with distilled water.

(ii) The pH, in the range from 5,5 to 8,0, plays no significant role in precipitation.

(iii) In media containing Na^+ and K^+ ions the virus is readily precipitated. In media containing Ba^{++}, Ca^{++} and Mg^{++} ions complete precipitation occurred only at low concentrations exerting a deleterious effect on the organism.

(iv) Ultracentrifugal and electron microscopical studies carried out with the concentrated viral preparation are described.

(v) A new serological phenomenon, the slide agglutination brought about in the concentrated viral preparation by immune serum is reported.

Acknowledgement. It is a pleasure to express my thanks to the Electronmicroscopical Laboratories of the Hungarian Academy of Sciences for the facilities required for making micrographs. Personally, our thanks are due to Dr. B. Lovas for his assistance in the electron microscopic studies, and also to Drs. V. Cieleszky and E. Sándi, for making the densitograms.

LITERATURE

1. *Takátsy, Gy.:* Acta Medica III. 2. 185 (1952).
2. *Dömök, I., Farkas, E.* and *Gál, M.:* Népegészségügy. **32**. 449. 1951.
3. *Takátsy, Gy.:* Kísérletes Orvostudomány **2**, 393 (1950).
4. *Takátsy, Gy.:* Kísérletes Orvostudomány **4**, 60 (1952).
5. *Schulek, E., Fóti:* Magyar Chemiai Folyóirat **6**, 406 (1949).
6. *Cieleszky, V., Sándi, E.:* Kísérletes Orvostudomány **5**, (1953).
7. *Gard, S., von Magnus, P., Svedmyr, A.* and *Birch-Andersen, A.:* Arch. ges. Virusforsch. IV. 5, 591 (1952).
8. *Taylor, A. R.:* J. Biol. Chem. **153**, 675 (1944).
9. *Doerr, R., Hallauer, C.:* Handb. der Virusforsch. Ergänzb. II, 272 (1950).
10. *Dawson, L. M., Elford, W. I.:* Nature **163**, 63 (1949).
11. *Takátsy, Gy., Fürész, J.* and *Farkas, E.:* Acta Physiol. Hung. *5*. 241. 1954.
12. *Еремеев Г. В.*: Вопр.Мед. Вирусологии II, 263 (1949).
13. *Jensen, K., Francis, T. Jr.:* J. Immunol. **70**, 3. 321 (1953).
14. *Knight, C.:* J. Exp. Med. **83**, 281 (1946).

ОСАДОК ВИРУСОВ, ИЗГОТОВЛЕННЫЙ НОВЫМ, ПРОСТЫМ СПОСОБОМ

Ю. Такачи

Резюме

Автор продолжал свою ранее опубликованную работу о методах очистки и концентрации вируса гриппа. В данной работе он исследовал условия осаждения вируса. Установил, что очищенный путем адсорбции и элюции красных кровяных телец, вирус гриппа осаждается из гипотонического раствора солей даже и тогда, когда концентрацию солей снижают не диализом, а путем разбавления дестиллированной водой. Интервал pH 5,5—8,0 в осаждении существенную роль не играет. Если среда содержит разные ионы, степень осаждения будет разная. Из среды, содержащей ионы Na^+ и K^+ вирус хорошо осаждается, из среды, содержащей ионы Ba^{++}, Ca^{++} и Mg^{++} осаждение происходит медленно. Автор излагает свои исследования с концентрированным и очищенным вирусом с помощью ультрацентрифуги и электронного микроскопа. Автор определил коэффициент осаждения вируса гриппа с помощью абсорбции света и по шкале Ламма. По изменению кривых Ламма можно сделать вывод по поводу присутствия в препарате инкомплетного вируса. Автор помещает электронмикроскопические снимки препаратов очищенных и концентрированных вирусов, снимки об осаждении вирусов, о нитевидных формах вируса гриппа, а также об адсорбции вируса на строме куриных красных кровяных шариков. Кроме этого автор знакомит с новым серологическим методом, методом агглютинации на предметном стекле, с очищенным и концентрированным вирусом, под действием специфической иммунной сыворотки.

STUDIES ON SPORULATION IN YEASTS AND SOME PROBLEMS OF IMPROVING YEAST STRAINS

A METHOD OF THE SUBMERGED CULTURE TYPE FOR INDUCING MASS ASCOSPORE FORMATION IN YEASTS

B. PAZONYI

Agrobiological Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest

Received, July 15, 1953

I.

INTRODUCTION

Sporogenesis and methods aimed at inducing ascospore formation are cardinal problems in yeast research. (When referring to induced ascospore formation, the term »sporulation« is commonly employed in the literature. In the following, this term will be used.) Ascosporogenous and non-ascospore-forming yeasts differ markedly in this respect. Sporulation is an uncertain and complicated procedure in ascosporogenous yeasts. Nevertheless, the most reliable and consequent markers of yeasts are the patterns of asci and of spore configurations, as well as the shape of spores. Much is revealed of the yeast by the type of germination from the spore. Sporulation is of importance also because yeasts can be crossed mostly by means of bringing together parents in the spore phase and because hybridization occurs mostly at the time of germination from the spore, or, in some cases, prior to ascospore formation.

Certain factors involved in sporogenesis, e. g. thermal range, massiveness or scarcity or specific conditions, special requirements and connection with, or independence of, copulation, are characteristic markers of yeast strains and allow important conclusions as to the properties of the strain to be tested. The complexity of the problem accounts for the immense work spent on attempting to throw light on the circumstances and conditions of sporogenesis.

The sporulation method most frequently used is the »Paris plaster« method, introduced by *Engel* [1]. This or one of its various modifications are employed most commonly. In other methods cement, porcelain, wood blocks or cubes of potato or carrots, etc. are employed.

Beijerinck [2] uses repeatedly washed agar; *Gorodkova* [3] recommends the addition of small amounts of salts, beef extract and dextrose. American authors favour sporulation media consisting of a variety of boiled vegetables. There are some who think the juice of plum jam to be the best sporulation medium; others claim this for grape fruit juice. Presporulation media are employed by some workers, while others prefer the admixing of various chemi-

cals. Many think acid reaction favourable, while others advocate alkaline reaction in sporulation media.

This very sketchy account of sporulation methods in itself indicates that although some methods have been found to be of value, still they were applicable only to certain species or just to some strains of a certain species, while in connection with other strains they proved weak or totally worthless.

The best results to this date have been obtained by *Adams* [5], by a technique derived from the method of *Stantial* and *Elder* [4]. *Adams* obtained high ascospore yields from baker's yeast by means of presporulation in tomato juice and subsequent sporulation in a sodium acetate medium. First my sporulation method was similar to that of *Adams*, but after the initial informative studies I have employed different methods.

(*Note : Stantial*, on basis of the unpublished results of *Elder*, transfers cells multiplied in tomato broth into sterile distilled water. In each ml of suspension 20 million cells should be present and to this 2 mg of dextrose and 15 to 20 mg of sodium acetate are added. *Adams* recommends presporulation on a tomato medium, followed by transfer onto a solid medium. His sporulation medium consists of 0,04 per cent of dextrose and 0,14 per cent of sodium acetate dissolved in distilled water, 2 per cent of agar and traces of pepton.)

Since the cause of sporogenesis is unknown, the theoretical basis of sporulation is also obscure. This accounts for the diversity of methods employed in sporulation studies.

In view of the great differences existing between the individual yeasts in respect of their mode of life, environmental requirements, source of food, etc., it is evident that for study types similar from these points of view should be selected. It is known that deep-rooted differences exist between the brewer's, baker's, wine and alcoholic yeasts in the mode of life and in metabolism and wide variations occur even within the single types. If we extend the list to the numerous yeasts of the oxidative type, it will be quite clear that it would be premature to make attempts at finding a sporulation method applicable to every type of yeast. The requirements of the single types should be elucidated and met first.

It should be also borne in mind that a method capable of inducing poor sporulation, with only one or two spores among a crowd of cells showing under the microscope, would not be satisfactory at all. Of the millions of cells millions should be induced to form ascospores, i. e. *mass sporulation* should be induced.

In view of this, we set aside the methods used by *Adams* and by most of the other workers, involving smearing or spreading of the material. After eliminating the initial difficulties, the multiplied mass of yeast was induced to form ascospores in a liquid medium.

The essence of sporogenesis as a phenomenon of life is still subject to controversies. According to the universally accepted view, sporogenesis in yeasts

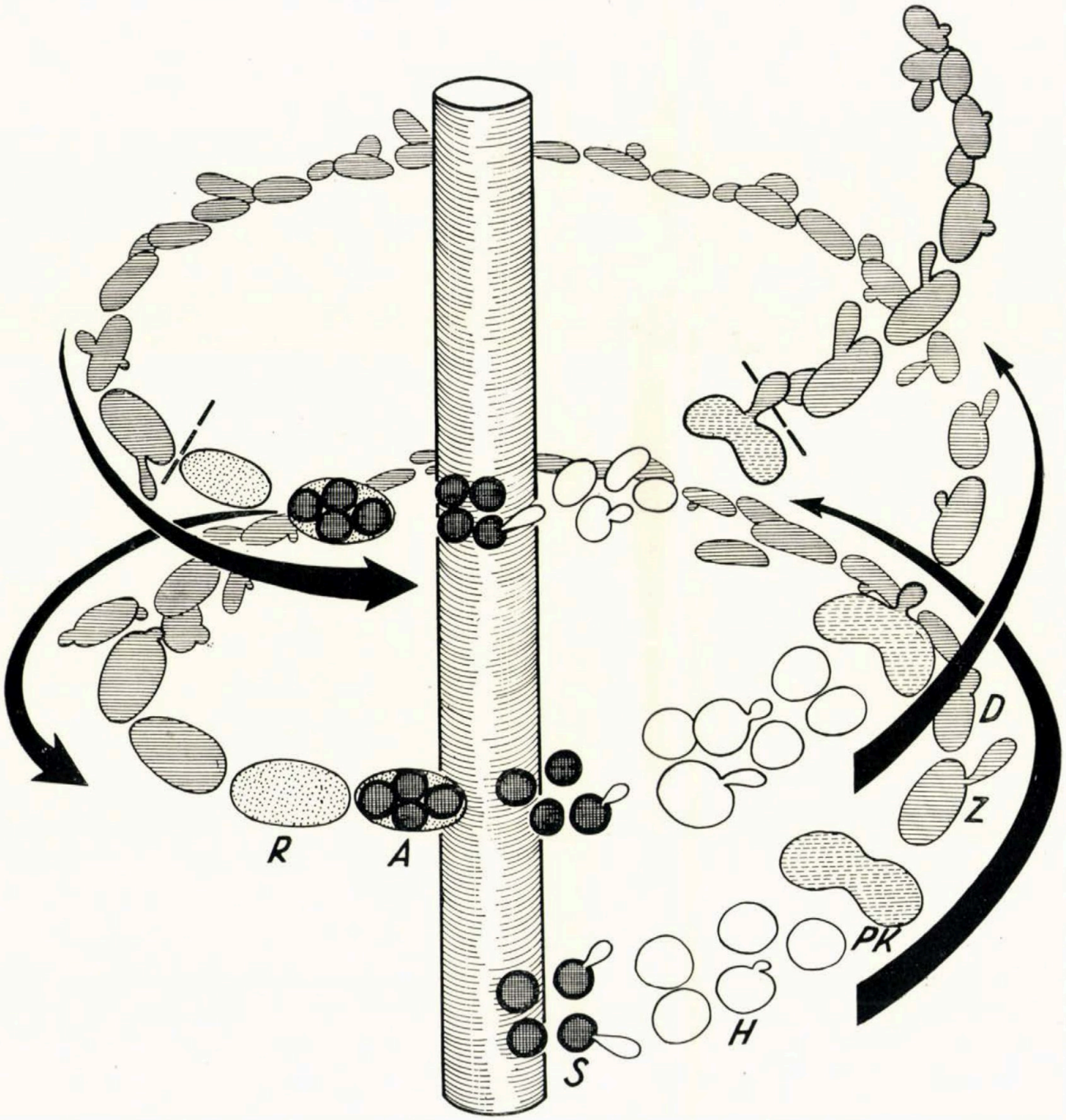


Fig. 1. One of the types of the alternation of generations in yeasts of the Saccharomyces type. Partly schematic picture. Haploid generation labelled with H and diploid with D. S, spores. R, reduction division. PK, plasmo- and kariogamy. Z, zygote

would be induced by unfavourable environmental conditions, just as is the case with bacteria. The most devoted propagator of this view is *Welten* [6]. Other workers, on the other hand, express the opinion that sporogenesis would be a natural and essential activity of yeasts and as such it would be in close connection with the sexual phase.

The sexual phase of a Saccharomyces was studied in detail by *Guilliermond* [7], *Kruis* and *Satava* [8] and *Winge* [9]. *Winge* and his associates, and later, *Lindegren* and his followers threw light on the course of alternation of generations in yeasts and on the types of diploidization. On the basis of this knowledge a great number of hybrides were created with strains and species of different types by the above authors, as well as by *Kosikov* and other Soviet authors with the main point that strains fermenting different sugars and differing in enzyme systems were crossed.

The yeasts of the genus Saccharomyces are diploids in their vegetative-fermenting cells. Meiosis takes place in these cells and the cell develops into an ascus, i. e. ascospores appear in it. The spores liberated from the ascus germinate, remain haploids for various lengths of time and turn diploid later by means of plasm and nucleus fusion. In this way arises the diploid yeast cell that is capable of multiplying in unlimited numbers by budding. The mode of life and alternation of generations of Saccharomyces is shown in Fig. 1.

It can be seen in Fig. 1, too, that spore formation means the beginning of the sexual phase.

1. Review of earlier investigations

Before discussing the directions and aims of the present study I shall briefly review my earlier work in the field of yeast research in order to make the subject easier to understand. At the beginning of the investigations a great number of strains were examined, in order to obtain general information. The strains involved were 75 Hungarian wine yeast strains and 20 foreign strains from the collection of the Ampelological Research Institute and 12 strains from the Delft collection ; various types of baker's, brewer's yeasts, freshly collected »wild« yeasts, etc. The majority of strains examined belonged to the Saccharomyces genus, but a species of Hansenula anomala I had isolated and specimen of *Zygosaccharomyces Marxianus* were also studied. After the information sought had been obtained, the number of strains to be examined was reduced from about 120 to the 75 Hungarian wine yeasts [10].

In the first series the solid sporulation medium method of *Adams* was used. Inoculation was carried out by means of a loop. The strains in our collection are stored under paraffine oil and are transferred once in every year. The inocula were obtained from this material. After presporulation for one

week the 120 strains were carried over onto the sporulation nutrient medium and simultaneously a loopful of the mother colony was smeared directly on the sporulation surface. In the first case it was achieved that the 120 strains multiplied during the one week period of aerobic life on a glucose-tomato juice presporulating medium before being sporulated ; in the other case a parallel series was induced to sporulate in consequence of being smeared directly on to the medium from the resting phase (from under oil).

In this way it was rendered possible to carry out comparative studies with the 120 strains both after presporulation under aerobic conditions and after anaerobic treatment. After an investigation period of about four weeks the sporulation percentage was evaluated.

These studies revealed that a great number of the strains, which did not sporulate on the Paris plaster block, did so when treated by this method. The Hungarian and foreign wine yeast strains showed the following configurations in the *asci*.

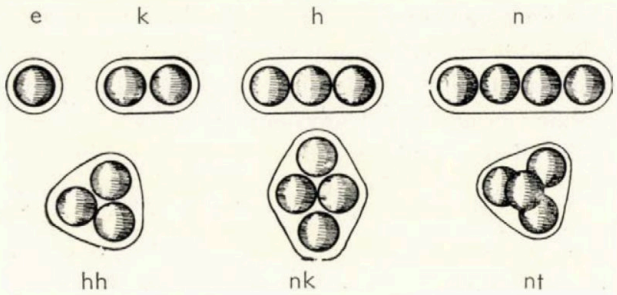


Fig. 2. Types of grouping of spores in the asci of Hungarian wine yeasts (schematic picture)

Some strains contained all the types of grouping. The majority, however, was variable in this respect, although exhibiting the same combinations. A few possessed 1 or 2 spores in the *asci*, and some were single-spored. These configurations represent serviceable means for morphological differentiation, since it is characteristic of every strain what configuration and what combinations their ascus displays.

These investigations have confirmed and completed the similar studies of *Soós* and *Ásvány* [11], who had investigated the sporulation of Hungarian wine yeasts with the Paris plaster block method. To this date only 6 of the 75 strains have proved to be non-sporogenous and it is hoped that even some of them will be induced to sporulate.

The comparison of sporulation after aerobic preliminary treatment with that after anaerobic one under the physiological conditions specified, revealed that sporulation was more effective after the anaerobic resting phase than after a partly oxidative presporulation. After anaerobic preliminaries, most of the

strains sporulated within a shorter period and the number of spores within the individual strains was also greater. Only supposition can be brought forward to explain this phenomenon. The fact in itself is, however, of significance since it shows that in similar sporulation experiments it is not at all necessary to carry out the time-wasting, complicated and costly presporulation treatment. Presporulation has proved to be advantageous only in that respect that it increased the number of ascospores within the single asci, i. e. multi-spored forms were present in greater numbers. Whether this was due to the partly oxydative nature of the antecedents, to some active factor in the tomato juice, or to some other cause, is, of course, still an open question.

In another series the Hungarian wine yeast strains Tokay 22, Eger 1 and Balatonfüred 2 were studied in detail *(Pazonyi* [12]). Attempts were made to find out whether an actively fermenting strain would or would not lose some of its fermentative activity on sporulation. It is namely possible that culture-yeasts, which, according to *Ásvány*, *Nyerges* and *Zsolt* [13], are capable of fermenting from musts of a high sugar content as much as 18 vol per cent alcohol, may lose their favourable »domesticated« properties in the course of the genetic phase, or else, these properties may become reduced, as a consequence of which loss of adaptation would occur.

In my paper cited above I have described in detail the fermentation experiments carried out with the population of the 3 wine yeast strains mentioned. Meanwhile from that same population zygotes were induced to sporulate. By means of a micromanipulator ascus cultures were made, which were then induced to multiply in a hanging drop. The cultures were then transferred into a fermenting dish and induced to ferment under conditions similar to those prevailing in the initial experiment. The two methods yielded substantially identical results, indicating that transsporulation caused no diminution in the fermentative capacity.

On basis of this evidence it appeared justified to reproduce the experiment on a larger scale, i. e. in casks, according to the prescription of ampelological practice. In the experiment, however, mass sporulated material was already used.

2. Methods and results of recent investigations

a) The desired end, the induction of mass sporulation in wine yeasts was attained by the following method.

The strain of wine yeast selected for the experiment is multiplied in must diluted to the double volume with tap water. Into each of 16 Erlenmeyer flasks of 1 litre capacity, a quarter to a half litre of material is inoculated. The sugar content of the medium is approximately 12 g/100 ml. The flasks are continuously agitated. At 22 to 25°C the strain increases in number in about 4 to 5 days,

during which time it utilizes the sugar of the medium either for building up its body, or stores it in incorporated form, or ferments it to alcohol and CO_2, or uses it up for respiration.

When on sampling the sugar is found to have disappeared from the medium, i. e. the logarithmic phase of multiplication has been terminated, the material is allowed to settle for 24 hours. Meanwhile the multiplication reaches the phases of retardation and rest. Then the alcoholic liquid is decanted from the settled mass. The cells in the flasks are washed with distilled water and pooled and

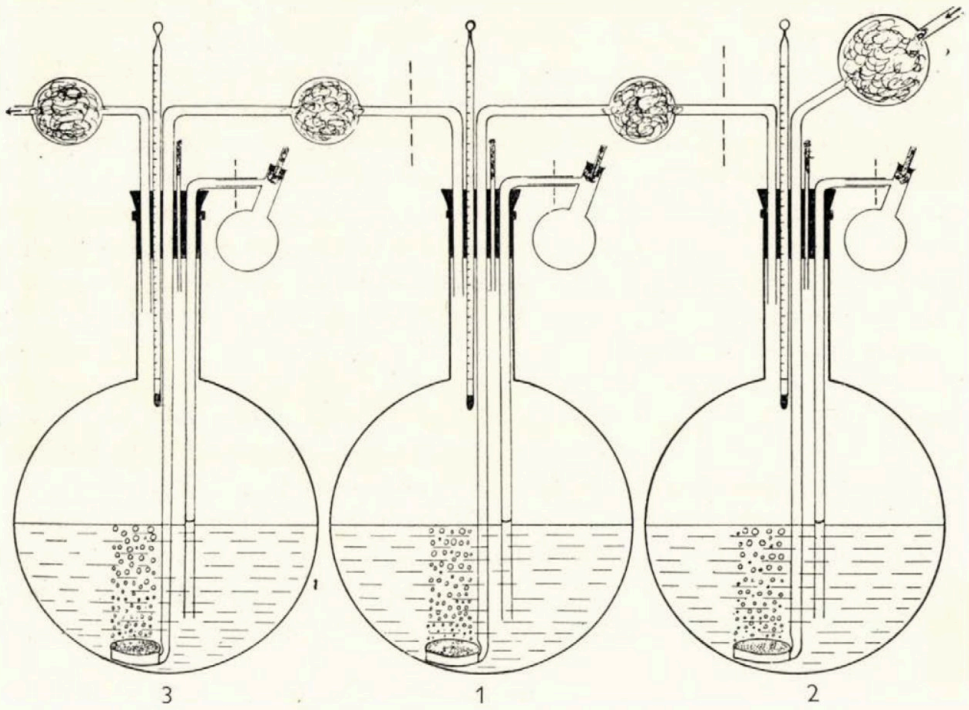


Fig. 3. Diagram of the submerged culture sporulation unit (details in text)

the solids are sampled. Under sterile conditions the yeast suspension thus obtained is transferred into the sporulation unit.

In the simplest case the unit is a single 5 or 10 litre round flask made air-tight by means of a rubber stopper, raw rubber and cotton packings. The rubber stopper is perforated at five sites for the insertion of tubing, through which the air moves in and out and through which inoculation and sampling are also carried out. The fifth perforation in the rubber stopper holds a thermometer.

Usually 3 flasks of five litre capacity each were connected serially. The sporulation medium is added to each of the flasks, which are sterilized one by

one. As a liquid medium I have used 2 to 2,5 litres of distilled water containing 0,04 per cent of glucose, 0,14 per cent of sodium acetate and traces of pepton.

Figure 3 shows the sketch of the unit.

The pooled yeast mass is divided into three equal parts to be carried into the three serially connected flasks through the inoculation tubes.

The flasks bear a heat insulating covering. Not only the volume but also the temperature of the circulating air is controlled and adjusted to the desired temperature (usually 25°C) by pre-heating. A thermometer shows the temperature of the system in each flask.

It is easy to take uncontaminated samples, since any amount of the liquid can be transferred by a simple manipulation into interchangeable fractionating flasks.

The air pressed into the system passes through a cotton filter. Individual flasks can be isolated from each other with cotton filters.

From the samples the pH of the sporulation mass can be estimated; stained preparations can be used not only for estimating the ratio of asci to vegetative cells, but also for determining the proportion of live cells to dead ones *(Kurusz* [14]).

By means of the above unit, studies in the course of sporulation were carried out with the very actively sporulating strain Balatonfüred 2, with strain Eger 1, displaying a medium rate of sporulation and with the Tokay 22 strain which had been considered non-sporulating. In the graphs of the Figures the number of days of the experiment appear on the horizontal axis, while on the vertical one are represented the temperature, the volume of air pressed into the system, the pH and the number of asci formed the last value in percents of the total cell count (Fig. 4, 5, 6).

The graphs show that strain Balatonfüred 2, after having been aerated with 24 cubic metres of air, sporulated at 24°C in 86 per cent on the fourth day. Strain Eger 1 showed a 85 per cent sporulation at 22°C, after aeration with the same volume of air. In the former instance the pH of the medium rose from 5 to 7, in the latter case from 4,9 to 7,0. Strain Tokay 22, hitherto thought to be non-sporulating, showed hardly any sporulation during the first few days. After increasing the air flow, a 45 per cent sporulation was obtained on the 6th day, at 24°C, with a parallel rise in pH from 5,1 to 8,4. (Values given are means of samples from three flasks.)

b) The sporulation unit described may be used also for studying the laws of sporulation and the factors involved in it. If in one flask physiological conditions differing from those in the other two are created by changing a certain factor, such as the temperature, the composition of the medium, or the chemical ingredients, the effect of that one factor on sporulation can be evaluated by comparison to the two control flasks.

I have studied so far only the effect of alcohol on sporulation. All three flasks were kept under the same conditions. In flask 1 (the one in the middle) alcohol concentration was adjusted to 10 volume per cent. Strain Badacsony 1, a wine yeast, was used in the experiment. After inducing multiplication by

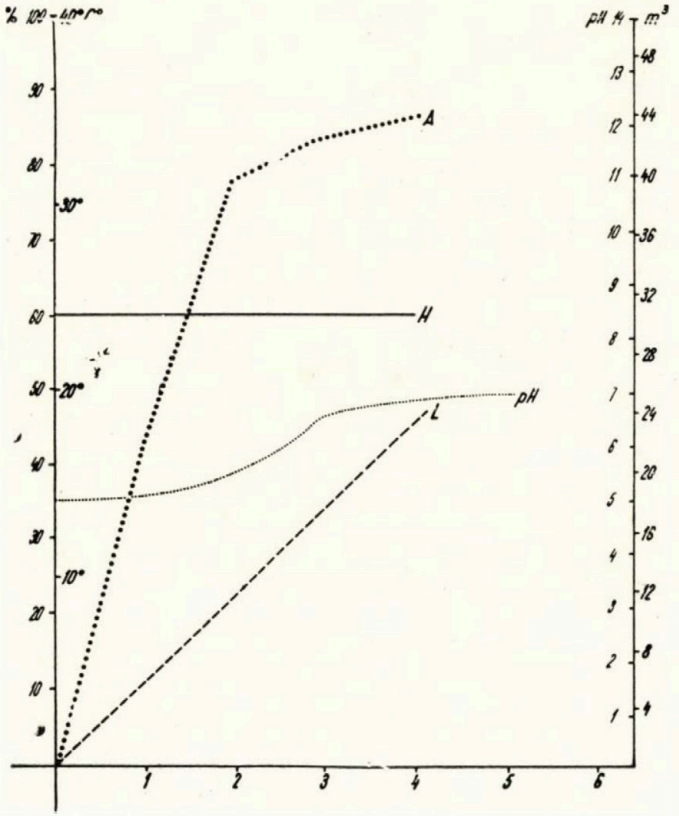


Fig. 4. Formation of ascospores in wine yeast Balatonfüred 2
Abscissa, number of experimental days. Left ordinate, percentage of formation of ascospores and temperature ; right ordinate, pH and volume of air flowing through the system in cubic metres

the method described above, the material was divided into 3 equal parts and transferred into the three sporulation flasks.

In the moment aeration was started, in flasks 2 and 3 (the first and the last one), conditions favourable for sporulation prevailed, since these contained a normal sporulation medium. After 24 hours signs of sporulation could already be detected in these flasks.

On the second day, however, the circulating air carried such an amount of alcohol vapour into flask No 3 from flask 1, that the alcohol concentration in the former rose to 1 volume per cent. On this day in flask 2 already 12 per

cent of the cells were transformed into asci. Flask 1 contained no asci at all; in flask 3 only 1 per cent of the cells was found to have formed asci.

On the fifth experimental day yeast Badacsony 1 showed mass sporulation (70 per cent) in flask 2. In flask 1, in which the concentration of alcohol was

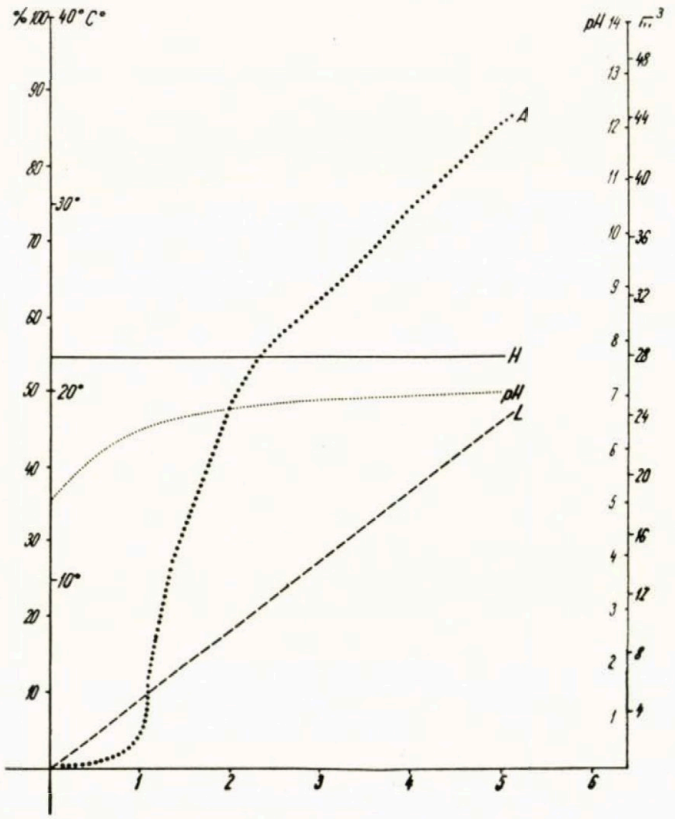


Fig. 5. Formation of ascospores in wine yeast Eger 1

maintained by means of refilling at a level of 10 volume per cent no spores were formed. In flask 3 the slowly rising alcohol concentration blocked sporulation totally on the third day, so, that it hardly exceeded 1 per cent. The sporulation-blocking alcohol threshold was found to be 1,5 vol. per cent in the experiment.

c) By means of the method described under *a)* a mass of wine yeast was transsporulated and studied at the Badacsony Experimental Plant of the Ampelological Research Institute. This experiment was a large-scale reproduction of the experiment *in vitro*, in which the fermentation of not sporulated populations were compared with each other, according to the usual ampelological routine.

In the autumn of 1952, during the vintage, similar amounts of the same must containing 26,5 g per 100 ml of sugar were measured into five flasks holding 100 litres each. Two casks were inoculated with strains Tokay 22 and Balatonfüred 2, respectively. The strains originated from the collection of the Ampelo-

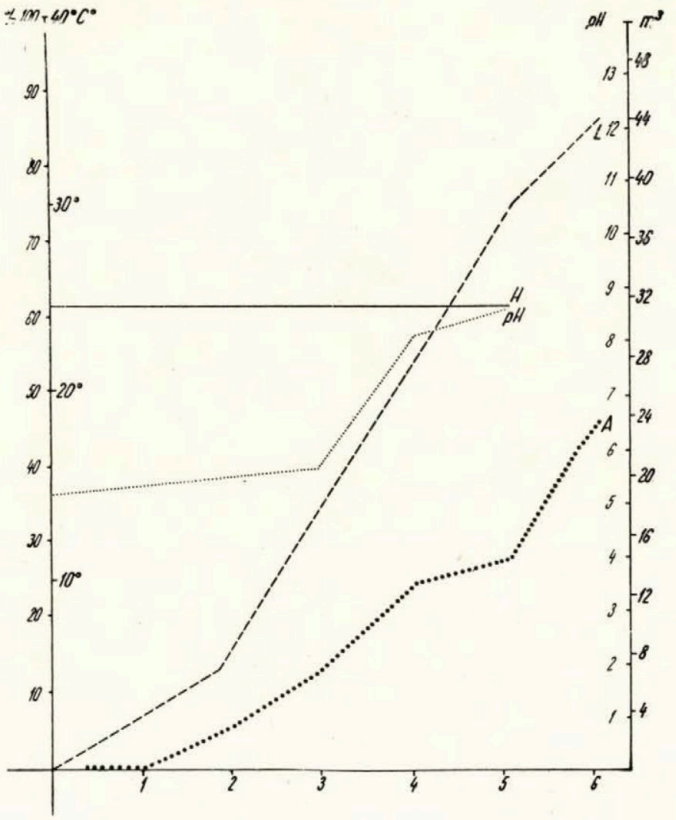
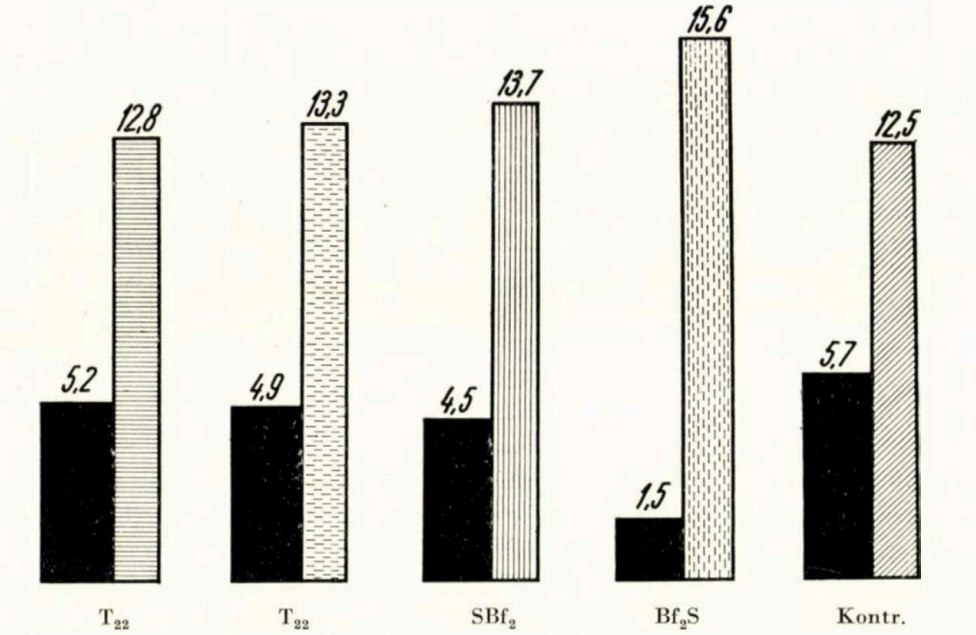


Fig. 6. Formation of ascospores in wine yeast Tokay 22

logical Research Institute. The inoculations were carried out according to the rules of fermentation with culture yeasts. Two other casks were inoculated with similar amounts of a material obtained from mass-sporulated, resp. germinated colonies of the same strains. Cask No 5 was left to ferment with the local strains. The four casks were inoculated on October 27.

During fermentation the reduction in the amount of sugar, and the increase in alcohol concentration were serially determined. The ratio of these two charac-



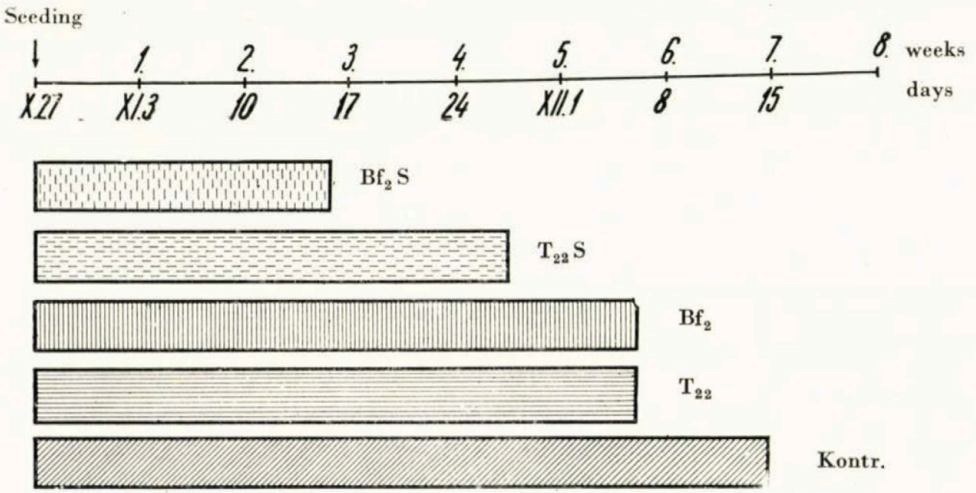


Fig. 7. Fermentation by sporulated and non-sporulated culture-yeasts
Above, relation of sugar to alcohol on the 13th day following inoculation. Below, duration of main fermentation by sporulated and non-sporulated strains. S, sporulated culture-yeasts

teristic factors on the 13th day of fermentation is shown in the upper part of the graph.

The end of the main fermentation, when no significant amounts of sugar are present any more, set in at an alcohol concentration of 16 volume per cent. Variations of this end point in fermentations of different origin are shown in the graph representing the time of fermentation.

It can be seen that the sporulated strain Bf 2 S of the Balatonfüred 2 yeast, consumed sugar at a very high rate, so, that its main fermentation was completed on November 16, i. e. within 21 days. The sporulated Tokay 22 strain, designated T 22 S, fermented in a period of 31 days. The non-sporulated culture-yeasts completed fermentation by the end of the fifth week, while the control required 7 weeks.

Discussion

As it has been pointed out in the introduction, the main difficulty lies in the fact that the theoretical basis of sporogenesis not being clarified, sporulation methods based on different theoretical principles and the diversity of the procedures employed only increase confusion. In addition, most of the authors studied and carried out comparative studies on sporulation with different strains, often of entirely different types.

Another serious disadvantage is the fact that the sporulation methods described and recommended are not reproducible twice or three times in succession under identical conditions; they are applicable to small amounts of material only; the active factors cannot be defined exactly, and the observer is forced to depend on conjectures.

The mass sporulation method described under *a)* helps to eliminate these shortcomings. Instead of the superficial smears hitherto employed, submerged cultures are used. The clearly defined amounts of salts and nutrients added make it possible to obtain reliable data concerning the chemical composition of the medium. Aeration, temperature and other factors can be regulated; the proportion of yeast to medium is shown by the amounts of solids contained.

Since it becomes possible to obtain practically any amount of asci, the large mass of spores yielded may be submitted to biochemical studies. The mass production of spores renders mass diploidization possible, i. e. mass sporulation is also of a genetical significance. The method allows to study the life cycles of the yeasts and by its aid even a directive influence can be exerted on the development of the yeast strain.

According to the experiment described under *b)*, in which, with the exception of a single factor, similar conditions are maintained in the single flasks allowing a comparison of the results, and conclusions as to the effect of the very factor, it becomes possible to study all the factors involved and

all the possibilities which may emerge in connection with sporulation. It is hoped that in the near future all factors influencing sporogenesis, i. e. extraneous conditions required for spore formation, will completely be elucidated with the aid of the method.

The experiments described under *c)* lack perfection in many respects and should be reproduced also in a larger scale. The only conclusion to be drawn at present is that strains induced to form ascospores showed an increased rate of multiplication and fermentation. However, this is important less for the ampelological practice than for alcohol industry. Very carefully conducted studies involving a large amount of material are needed along this line.

II.

PROBLEMS CONNECTED WITH THE IMPROVEMENT AND MAINTENANCE OF YEAST STRAINS

Both the experimental results with the sporogenesis-sporulation of yeasts described in Part I., the concepts of progressive biology open up new possibilities for improving and maintaining yeast strains.

Growth and development of higher plants are sharply separated concepts according to the progressive Darwinian biology. Growth means increase in size, with increase in the volume, size and number of cells, without any observable change in quality. Development consists in a series of irreversible qualitative changes occurring from the embryonal stage until death, the process presupposing a certain growth.

Rapid growth may accompany slow development and vice versa, rapid development may occur together with a moderate increase in volume. *Lysenko*'s example is most illustrative of the difference between the two concepts. The plantago grows on bad soil to be small in size, but develops rapidly, as indicated by the early blooming and early yield. In contrast with this, specimens on fertile soil show a prolonged period of growth, with an increase in volume, but their development is delayed, retarded, as indicated by the marked prolongation in blooming time.

In many fields of microbiology conditions may entirely differ from those for higher plants, since a great variety of organisms are involved. In the case of yeasts, however, the situation is much clearer, since the genesis and genetics of these organisms are relatively better known than those of other microbes.

The yeasts of the Saccharomyces genus are derived from ancestors whose newly formed cells do not separate, but form a tousled network. The spores are developed in the cells of this network.

In industry and in ampelological practice the vegetative cells of the yeasts are used, these being responsible for fermentation. Morphologically, they are either single cells or tend to form short chains. These cells correspond to the *body of the yeast plant*, and consequently the process of germination, since

it increases the body of the yeast, falls into the *growth phase.* Extraneous and genetical causes later on bring about maturation division in these cells, i. e. a phenomenon leading to the sexual process begins in consequence of the reduction.

Alternation of Saccharomyces generations has been dealt with in Part I. To this I only wish to add some data concerning the alternation of generations of the Zygosaccharomyces yeasts. To facilitate comparison, the schemes of the alternation of generations for the two types are presented, side by side (Figs. 8, 9).

In the life of yeasts of the Zygosaccharomyces type, in contrast with the Saccharomyces, the haplophase predominates. This is a prolonged phase during which the yeasts are fermenting and during which they multiply. The haplophase is terminated with copulation, which is followed by a *short* diploid phase. Subsequently, division by reduction ensues, then the ascus, with ascospores, is formed. After the germination of the spores the haploid vegetative cell produces cells of the Zygosaccharomyces type by multiplication with budding.

In the two diagrams presented, two extreme cases of the alternation of generations are shown. In reality there occur many intermediate forms between the two extremes, since on comparing the Tables it will be found that what appears to be two types of alternation of generations differ only in that in one case the diplophase predominates, whereas in the other the haplophase. This is the reason why in up-to-date taxonomy the Saccharomyces and Zygosaccharomyces genera are again classified in the same group, in spite of the significant physiological differences existing between them *(Lodder* and *Kreger van Rij* [15]).

A comparison of the diagrams with the life of the types reveals that it is not only from the genetical point of view that we may distinguish between haplo- and diplophase, also in the development physiology of these yeasts a vegetative phase (that may be either haploid or diploid) and a sexual phase may be differentiated.

The vegetative phase is characterized by the multiplication of cells and by an increase in volume. This phase is limited by the amount of nutritive material available. Depending on extraneous factors, the oxidative, fermentative or mixed types of metabolism may equally occur.

The most characteristic activity in the sexual phase is copulation. Other important functions in this phase are the formation of asci and sporogenesis. According to the present view, these functions may occur either before or after, but always in connection with, copulation, depending on species and physiological conditions. The sexual phase consists of the following important stages : reduction division ; ascus and ascospore formation ; resting phase ; formation of gametes by germination of spores ; copulation.

The life of yeasts in the vegetative phase, together with their life processes are rather well known, this being the form employed in the industry and most

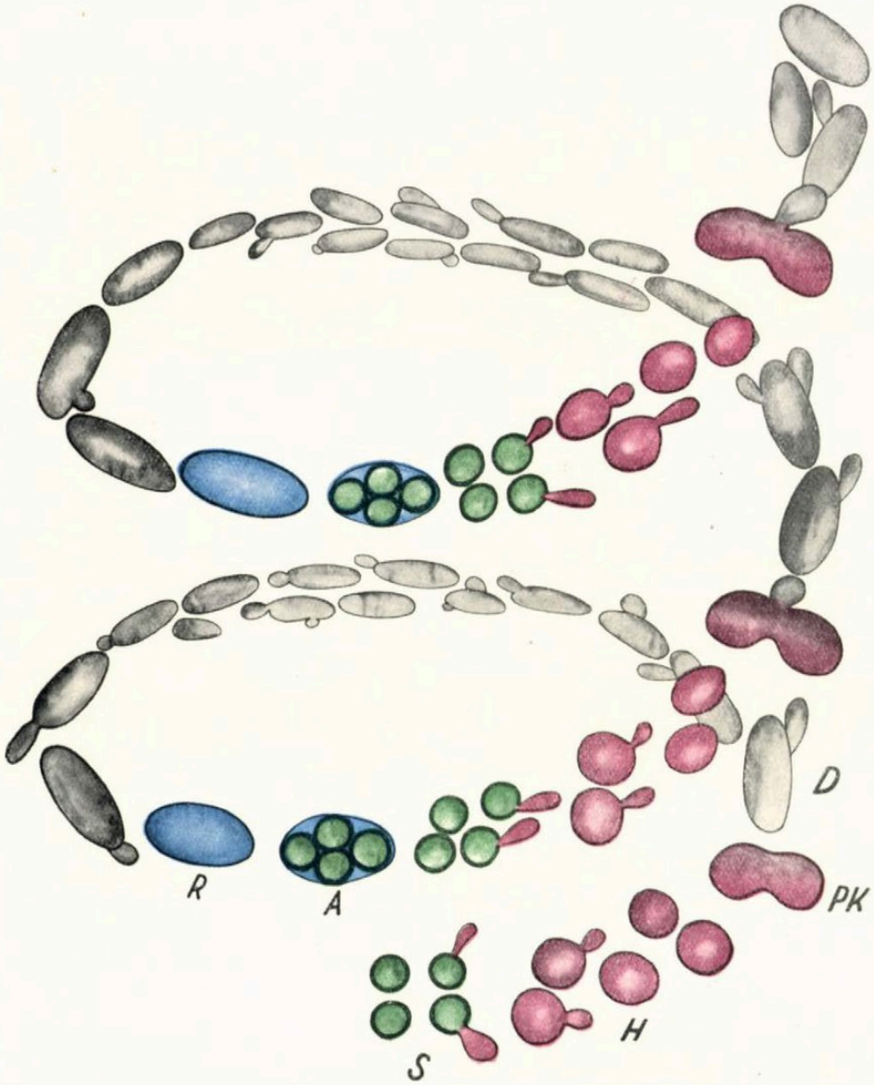


Fig. 8. Alternation of generations in Saccharomyces. Interpretation of colours : grey = diploid generation, pink = haploid generation, green = hapl. asci or spores, blue = meiosis. S: spore ; R: reduction division, A: ascus. PK: plasmogamy and kariogamy

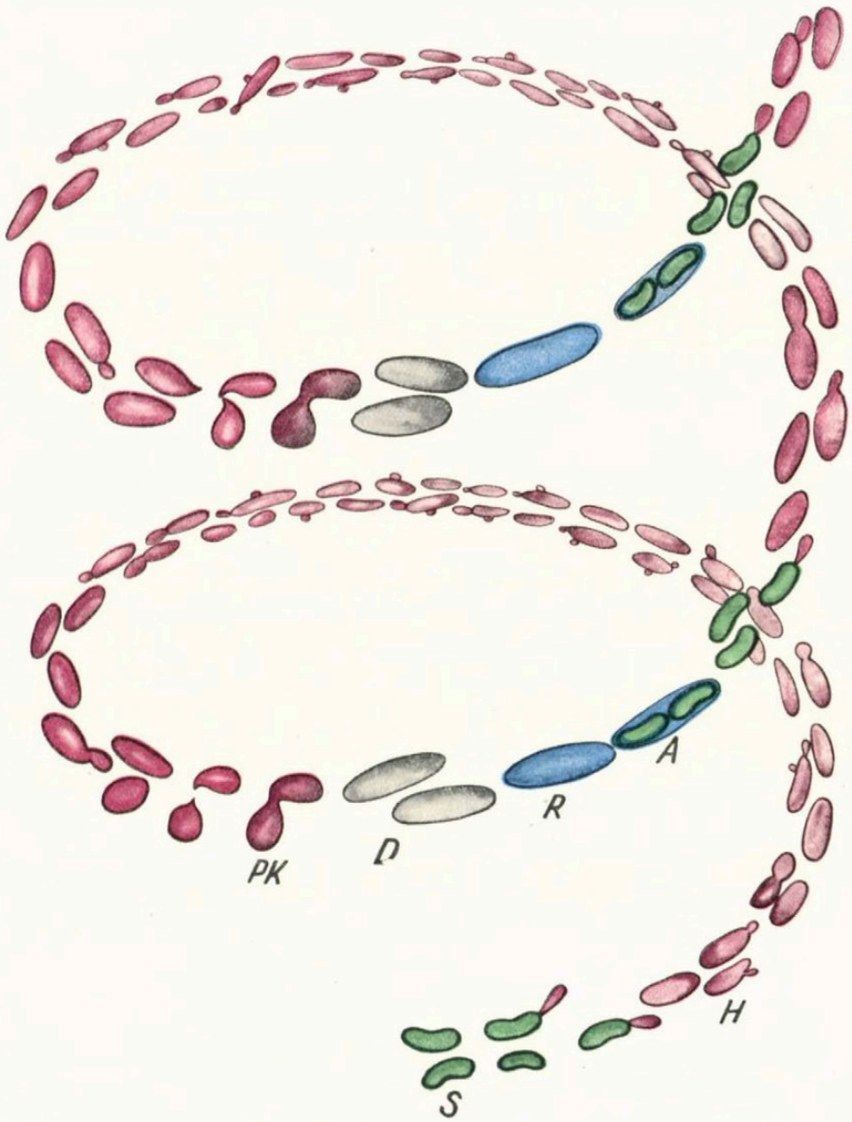


Fig. 9. Alternation of generations in Zygosaccharomyces. Interpretation of colours, grey = diploid generation, pink = haploid generation, green = hapl. asci or spores, blue = meiosis. S: spore, R: reduction division, A: ascus, PK: plasmogamy and kariogramy

subjected to research. However, very little is known of the *sexual* phase. This lack of information stimulated us to centre our attention on the characteristic features of this phase, i. e. on the conditions prevailing at the beginning of sporogenesis.

Before discussing the perspectives of our further investigations, it seems of interest to review the results and requirements of science and practice.

In 1951 and 1952 an interesting and instructive discussion on the principles of selection of microorganisms appeared in the Soviet periodical »Microbiologiya« to which fourteen scientific and industrial experts in the yeast problem contributed short papers. The Board of Editors summarized the debate, in the concern of which fundamental biological questions also emerged, mainly in the field of microbiology. Since the material of the debate has been made available for Hungarian microbiologists by our documentation service, I do not intend to expound it in detail, only points connected with the present problems will be discussed. It is a well-known fact that culture strains employed in the alcohol, brewing and baking industries, degenerate, even when handled with the utmost care. The time before degeneration sets in varies with the various strains, but after a certain period even the best strains must be taken out of production, owing to the loss in favourable properties.

The same is valid for strains in collections, although here the rate of deterioration is not so rapid, so that stored strains often help the industry in overcoming serious difficulties.

The fight against the weakening of strains has begun with the introduction of young strains, storage at low temperature, by means of employing laboratory conditions similar to those used in industry, etc.

In his paper opening the debate, *Kudryavtzev* [16] recommended for preventing deterioration to select from the strains adapted to local conditions the best zygotes, and carry them back into production. The method has its merits, but is not entirely satisfactory, since in consequence to the standard and optimal conditions of life that must be created for the sake of smooth production capacity, no shattering of properties results and improved strains cannot be obtained by this method. According to the Board of Editors the method might be of use, but it is of a passive nature, and it is active methods we need.

Beside selection, as active methods, hybridization and directioned cultivation have been recommended by the authors participating in the discussion. The Editors in their summary do not underestimate the search for serviceable forms in nature and in factories, but attribute greater significance to attempts at actively changing the properties of microbes. Unfortunately, no directives are given, apart from referring to the method of *Sayenko* [17].

The difficulties of maintaining collection cultures are also discussed. Collections are essential in the interest of both science and industry. It is stated

that the Hansenian methods introduced some 80 years ago are out of date, but there are no new methods to replace them. To elaborate such methods should be one of the aims of research in this field.

Finally it has to be pointed out that, according to *Kudryavtzev*, in liquid media the fermenting Saccharomyces show only the vegetative type of multiplication, and form no spores. Thus, the sexual phase, usually observable in connection with the germination of spores, falls out completely. In this connection reference is made to the fact that *Kosikov* [18] has directed attention to the possibilities offered by hybridization and adaption of hybrids with shattered properties.

It had already been pointed out by *Darwin* that every biological species resorts to cross fertilization from time to time. Progressive biology has taught us that it is the sexual process, the process of fertilization, that determines the viability of the organisms.

Consequently, in the experimental production of yeasts with well-defined properties it is not the diploid Saccharomyces cell that is important, but the cell in the sexual phase. It is during the sexual phase that the species is haploid and its properties become shattered and it is in this phase that development takes place. The deep-rooted biochemical processes in each stage of the sexual phase, from the reduction division until the germination occurring after the gametes had conjugated, might be the points of attack through which influence could be exerted upon the yeasts and alterations might be brought about in their properties.

The *sine qua non* of such an experimental interference is that the problem of mass sporulation-sporogenesis should be solved, both with wine yeasts and with yeasts of other types.

Influencing the life of yeasts and their sexual phase is not a recent trend. In Denmark *Winge* and his school, in the USSR *Kosikov et al.*, in the USA *Lindegren* and his followers created hybrides by the hundred. The methods used by these workers were based on the same principle. When possible, four-spored asci were used, in which two spores each belonged to one of the sexes (a and alpha, respectively). By means of a micromanipulator the spores are separated and taken up together with other separated spores from asci of the same or some other species in a hanging drop. In the common hanging drop the two spores or the progeny they yield may diploidize.

Some information on the possible combinations during diploidization is given in Fig. 10.

According to Fig. 10 spores originating from the same ascus may conjugate with each other within or outside the ascus (inbreeding) ; spores of different sexes may combine ; spores belonging to the same sex may fuse ; autodiploidization may result, or the cell may remain in the haploid phase. In addition, two or more asci of the same species may copulate (II) ; there may be differences

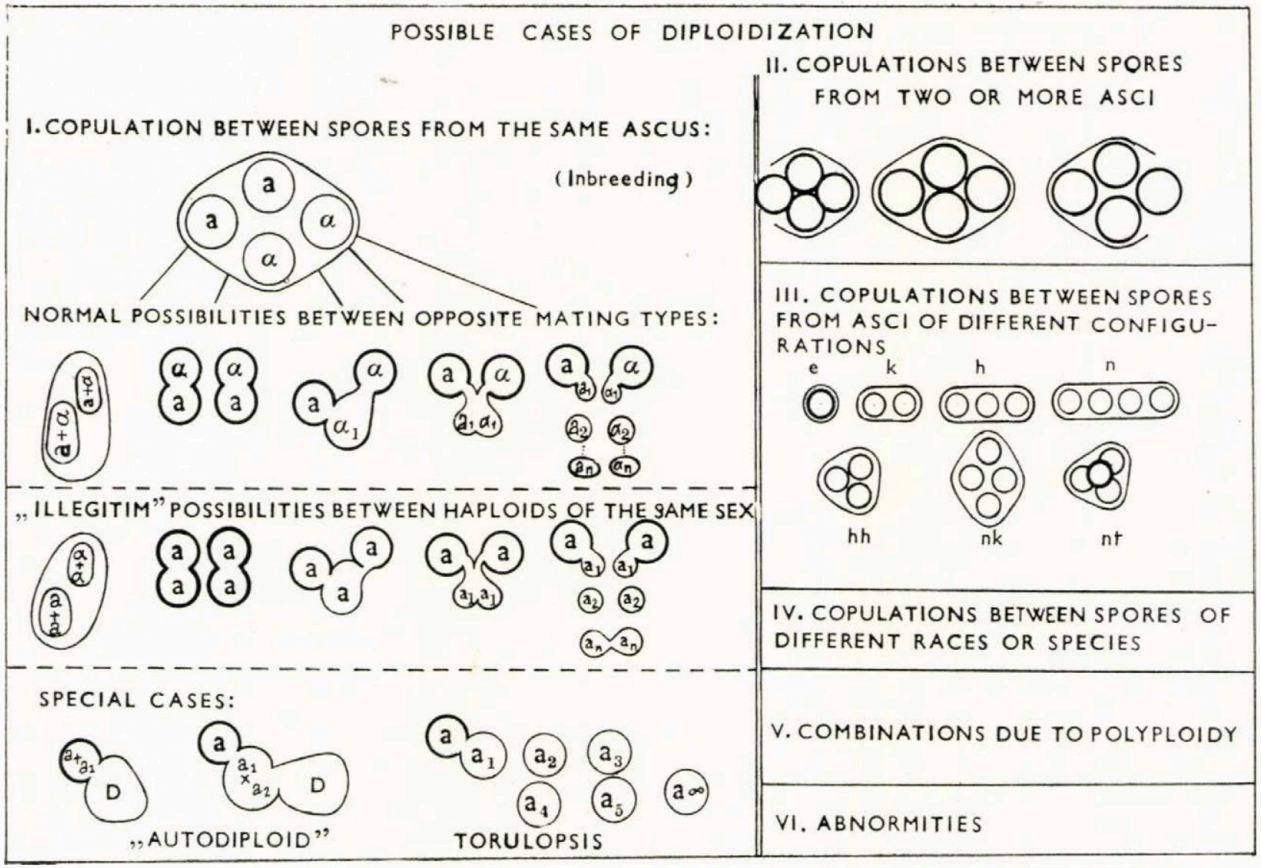


Fig. 10. Scheme of possible cases of diploidization. Explanation in text

between the spores of the same species, originating from asci showing different configurations (III). The possibilities offered by mating different races or species (IV), by polyploidy (V), and, finally, by frequent other abnormities should also be considered. All these show that even if a diploid has been produced between spores, it is extremely difficult to find out which of the possibilities should be held responsible for it. In spite of the fact that the spores have been brought together in a common hanging drop by means of the manipulator under control, this method does not permit much scientific foresight.

The results achieved in this field also support this view. The first Danish results obtained in the Carlsberg brewery showed Mendelian segregations. Investigations of American workers *(Lindegren, Spiegelman)* revealed facts which, having been unexplainable on the basis of the gene theory and with Mendelian segregations, have led the authors to elaborate their cytogenic or plasmogenic hypothesis. The latest results suggest that polyploidia may be present in yeasts *(Duraiswami* and *Subramaniam, Roman et al, Lindegren).* If this will be established beyond doubt, all the results hitherto obtained will have to be revaluated.

The difficulties are further increased by the fact that studying the cytology of yeasts is extremely complicated because of the minuteness and poor staining of the elements. Up to now, not even the number of chromosomes has been established with certainty.

The crossing techniques of *Winge, Ephrussi* and *Lindegren* lend themselves principally for studying the genetics of the fermentation of single sugars and are generally of a registrating character. *Pomper* [19], and later *Fowell* [20], have made attempts to improve *Lindegren*'s technique. Both authors induce haploid cells to copulate. *Pomper* prepares single cell cultures by spreading after diploidization and uses these for multiplication in order subsequently to obtain suitable diploid on an elective medium. *Fowell* isolates diploid with a micromanipulator and employs fermentation tests to decide whether the cell in question is really diploid and serviceable.

The procedures of *Winge, Ephrussi, Lindegren,* even in *Pomper*'s and *Fowell*'s modification alter, or eventually improve, commercial yeasts in a very limited extent, affecting at most one or two properties of the organisms. *The main disadvantage of these methods is that only properties already developed and their combinations are taken into account, while no attempts are made to influence or alter such properties.*

According to progressive biology, however, the future belongs to the experimental production of microbes possessing definite properties. In the case of yeasts, the requirements vary with the different yeasts. Alcoholic yeasts should have an increased tolerance to alcohol, should be able to produce an increased amount of alcohol at a higher temperature and at higher salt concentrations. Baker's yeasts should be of increased vitality and resistance,

and should multiply at a higher rate ; with wine yeasts the resistance to sulphurous acid and to cold should be increased, etc.

Requirements are, therefore, manifold and in order to obtain favourable results, deep changes must be brought about in the development of yeasts.

In the first part of the present paper, a procedure how to induce mass sporulation of wine yeasts has been described. Starting from this, I now delineate our future experiments intended to improve and maintain yeast strains.

Mass sporulation may start from single cell cultures, ascus cultures or from the population of one strain. The method described, with certain modifications, could be adapted to industrial purposes in such a way that we should

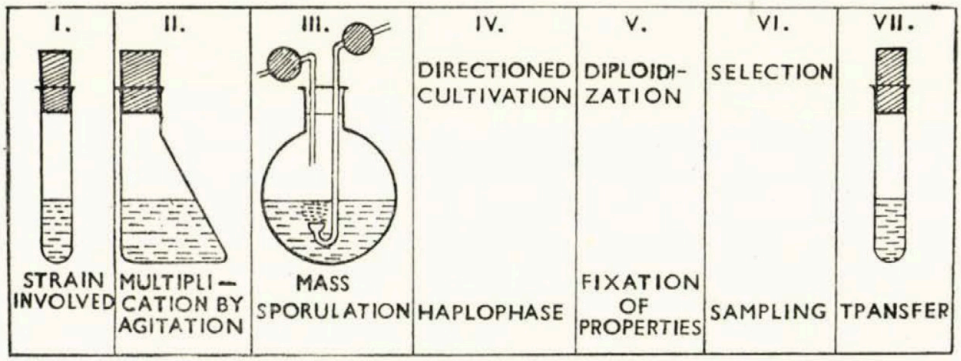


Fig. 11. Scheme of interference with the development of yeasts

have millions of spores at our disposal. In this way, millions and millions of zygotes would be involved in the sexual process.

The viability of strains would thus be increased in the first place by mass induction of the sexual phase.

Interference with the development, i. e. mass induction of sexual processes renders it possible to regulate not only the duration of the haplophase and the diplophase, but also the conversion of the growth phase into the developmental one, at the time desired and in any volume. In this way, it would not be necessary to labour with a few spores, but all properties of a strain or those producible by crossing different strains could be brought to light. Diploids with adequate qualities originating from mass crossing could be selected by appropriate methods.

In addition it would become possible to influence the properties shattered during the sexual phase. A theoretical scheme of these interferences is represented on Fig. 11.

The strain involved is induced to multiply by shaking (i. e. with oxidation and fermentation). Mass sporulation is induced. The millions of spores produced in this way, the germinating spores, the haploid cells, the diploidizing cells could be exposed to a variety of influences. Thus, the directing influence may consist in a directioned cultivation of haploid cultures ; mass crossing of haploid

cells and cultures ; mass adaptation of haploid cells and cultures to increasing concentrations of alcohol, salts, etc. ; cultivation of haploids under diverse conditions, with subsequent diploidization, etc., etc.

It may be anticipated that in the course of diploidization, recently acquired properties become fixed and that the zygotes possessing new qualities may be isolated and employed in production.

Duly considering the sexual processes, and by means of mass sporulation, we intend to elaborate up-to-date methods of maintaining yeasts. The outlines of this work are given in Fig. 12.

On the left side of Fig. 12 the Hansenian method is shown. The vegetative yeast cell storable for one year in a 10 per cent saccharose solution is transferred

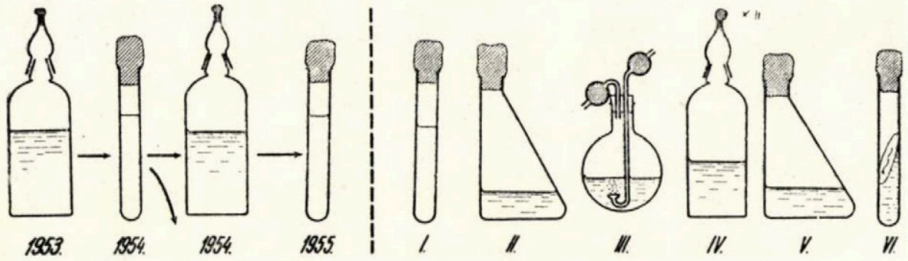


Fig. 12. A diagrammatical comparison of the Hansenian maintenance method with the new method
I; II ; III ; multiplication and mass-sporulation of the strain to be preserved. IV. Storage in the spore form. V. Germination, diploidization. VI. Selection

once a year. After a short fermentation period the vegetative yeast cell becomes again storable in 10 percent saccharose for another year. Inocula from this stock are used in production.

On the right side of Fig. 12 our new maintenance method is presented. The strain involved (I) is made to multiply by shaking (II), then mass sporulation is induced (III). Subsequently the material is stored in the spored state. Samples from the stored material may be transferred, induced to germinate (or subjected to directioned cultivation), and diploidized. The diploid strain most suitable for the purpose desired may then be selected.

As compared with the Hansenian method, the procedure means a certain progress, since with it the strains are maintained in the spore phase, an important role is allotted to the sexual phase and the possibility of improving the strains involved is given.

SUMMARY

The underlying cause of sporogenesis in yeasts has not yet been clarified and the lack of a theoretical basis accounts for the lack of perfection of sporulation methods. Preliminary investigations revealed that yeasts differing in the type of metabolism differ also in the type of sporogenesis.

For sporogenesis of wine yeasts a method of the submerged culture type was elaborated that lends itself for inducing mass ascospore formation in most of the strains. In an aerated liquid medium containing small amounts of glucose and sodium acetate mass sporulation (50 to 90 per cent) can be induced in five to six days.

The method allows to study the factors influencing sporulation one by one, since all conditions are under control ; the experiments may be conducted side by side or in series, with controls differing only in one factor. In experiments of this type it was found that under the physiological conditions specified the formation of ascospores was blocked by alcohol at a concentration as low as 1,5 vol per cent.

Experimental evidence was obtained that mass-sporulated strains used as culture-yeasts did ferment must more rapidly than non-sporulated culture yeasts of the same strain.

The phases of growth and of development are clearly discernible in the life of yeast strains. Hitherto most investigations were carried out with diploid generations and the sexual phase has not been given the attention it deserves, although this is the phase of development and the most suitable stage for actively influencing yeasts.

The possibility of influencing the development of yeasts by means of mass sporulation and a new method of maintaining yeasts superior to Hansen's method, are outlined. In both cases, introduction of the sexual phase into the life of yeasts is planned.

LITERATURE

1. *Engel, L.:* Les ferments alcooliques. These, Paris, 1872.
2. *Beijerinck, M. W.:* Cbl. f. Bakt. II. **4.** 657, 721. 1898.
3. *Городкова, А. А.* Главный Ботанический сад. Известия. Петерсб. **8**, 163. 1908.
4. *Stantial, H.:* Trans. Roy. Soc. Canada. **22.** Sect. 3. 257, 1928 and the »Second paper« ibid. **29.** Sect. 3. 175. 1935.
5. *Adams, A. M.:* Canad. Jour. Res. **27.** 179—189. 1949.
6. *Welten, H.:* Mikrokosmos. **8.** 3—5, 41—43. 1914.
7. *Guilliermond, A.:* Cbl. f. Bakt. II. Abt. **26.** 1910.
8. *Kruis, K. & J. Šatava:* O vývoji a klíčení spór jakož i sexualitě kvasinek. — V Praze, 1918.
9. *Winge, O.:* Compt. rend. lab. Carlsberg. Ser. phys. **21.** 4. 77—112. 1935.
10. *Pazonyi, B.:* Annal. Biol. Tihany. 1952.
11. *Soós, I. & Ásvány, Á.:* Szől. Kut. Int. Évkönyve. 1952.
12. *Pazonyi, B.:* Annal. Biol. Tihany. 1952.
13. *Ásvány, Á., Nyergesné & Zsolt, J.:* Agrártudomány. **1.** 1949.
14. *Kurusz, J. J.:* Biodynamica. 7 No. 132. 1951.
15. *Lodder J. & Kreger van Rij N. J. W.:* The Yeasts a Taxonomic Study. North Holland Publ. Comp. Amsterdam. 1952.
16. *Кудрявцев, В. И.*: Микробиология. XX. 2. 1951.
17. *Саенко, Н. Ф.*: Виноделие, Виноградарство. **2.** 22—26. 1950.
18. *Косиков, К. В.*: Микробиология. XX. p. 365. 1951.
19. *Pomper, S.:* Recent Developments in Yeast Genetics. Wallerst. Lab. Commun. XIV. 44. 1951.
20. *Fowell, R. R.:* J. Inst. Brew. **57.** 180—195. 1951.

ИССЛЕДОВАНИЕ СПОРООБРАЗОВАНИЯ ВИННЫХ ДРОЖЖЕЙ И ПРОБЛЕМЫ УЛУЧШЕНИЯ ДРОЖЖЕВЫХ ШТАММОВ

Б. Пазони

Резюме

Причины спорообразования дрожжей еще не выяснены и поэтому экспериментальные методы спорообразования не усовершенствованы из-за недостатка теоретической основы. Предварительными исследованиями установлено, что у дрожжей с разным обменом веществ спорообразование происходит различным образом.

Автор в первой части своей статьи подробно описывает метод, применяя который можно вызвать 50—95%-ное спорообразование винных дрожжей. Метод состоит по существу в следующем : предварительным взбалтыванием вызывается размножение дрож-

жей в разбавленном виноградном соке и дрожжи кладутся в раствор уксуснокислого натрия с небольшим содержанием в глюкозе. Дрожжи подвергнуты действию воздуха и после 4—6 дней можно вызвать спорообразование любого количества при физиологических условиях, которые можно вполне репродуцировать.

Применение этого метода дает возможность исследовать отдельные факторы, влияющие на спорообразование, потому что можно проводить исследование при одинаковых условиях, меняя только один из факторов. Так, например, проводя эксперимент при физиологических обстоятельствах алкоголь уже в 1,5%-ной концентрации прекращает спорообразование.

В ходе экспериментов автор обнаружил, что штаммы дрожжей, у которых вызвано массовое спорообразование, скорее вызвали брожение виноградного сока, чем такие же самые штаммы, у которых не было вызвано спорообразование.

Автор во второй части своей статьи описывает разные периоды жизни дрожжей. В жизни дрожжей наглядно заметен период роста и период развития. До сих пор авторы главным образом исследовали диплоидное поколение дрожжей и не обратили достаточное внимание на исследование периода размножения, хотя это представляет период развития в жизни этого вида. В течение этого периода можно успешно влиять на дрожжи.

Основываясь на методе, которым можно вызвать массовое спорообразование дрожжей, автор приводит возможные способы вмешательства в развитие дрожжей.

Лучшие штаммы дрожжей можно получить вызывая массовое спорообразование, адаптирование гаплоидных поколений, диплоидизацию и селекцию.

Способ сохранения, предложенный Гансеном уже не является пригодным. Автор в своей статье рекомендует процесс периода размножения, сохранение дрожжей в спорогенном фазе и селекцию.

COMPARATIVE STUDIES ON THE TOXICITY AND PROTECTIVE VALUE OF S. FLEXNERI AND OF ITS ISOLATED SOMATIC ANTIGEN

K. RAUSS and I. KÉTYI

Institute of Microbiology, Medical University, Pécs

Received July 23, 1953

One of the difficulties of immunization against dysentery lies in the fact that the toxicity of the essential polyvalent vaccine increases in proportion with the number of strain constituents. In investigations into the problem of dysentery immunization it appears justified to examine whether a product could be obtained from S. flexneri that would be less toxic than, and at the same time equal in immunizing power with, the whole bacterial cell.

As it is known, the investigations of *Boivin* and *Mesrobeanu* [1], *Raistrick* and *Topley* [2] have revealed that a relatively small part (about 10 per cent) of the bacterial cell is of immunobiological value, the major part of the cell being worthless in this respect. The active cell constituent, the somatic O antigen can be isolated from the bacterial cell by adequate methods. The above authors have also supplied evidence indicating that the toxicity, i. e. the so-called endotoxic effect, was also inherent to the somatic antigen.

Somatic antigen was obtained from S. dysenteriae by extraction with diethylene glycol by *Morgan* [3, 4], from S. flexneri by extraction with pyridine by *Goebel* et al. [5] and with HCl by *Smolens* et al. [6] with these somatic antigens animals and a few humans were immunized. The animals became protected against infection while in man agglutinins and mouse protecting antibodies were developed. The requirement for the use of isolated somatic antigen for immunization purposes is, however, that its toxicity and protective power should compare favourably with the similar properties of the whole bacterial cell. This problem has been dealt with by *Smolens* and his associates [5] and they have found that the substance isolated by them was less immunogenic and more toxic than the whole bacterial cell.

The investigations to be presented were intended to compare the immunogenic and toxic properties of the somatic antigen obtained by the *Boivin* method with those of the whole bacterial cell and also to find out whether the toxicity retained in the bacteria after extraction with trichloracetic acid could be eliminated by treatment with a more active solvent: pyridine. The *Boivin* method was the one of choice because in Hungary this simple method is used for producing antigen for the precipitated typhoid vaccine [7]. Another factor

inducing us to select this method was that according to preliminary experiments, *Boivin* extracts of adequate antigenic activity could be obtained also from S. flexneri. In the experiments the same bacterial mass was subjected to serial extractions, and the relation between the extract and the extracted organisms was examined during different steps. *Boivin* and *Mesrobeanu* [8] have carried out similar studies ; these, however, served different purposes as it will be detailed below. *Piccoli* [9] has also examined the antigenicity of bacteria extracted by the *Boivin* method in order to gain some insight into the antigenic properties of nucleoproteins. *Rédey* [10] studied trichloracetic acid extracted S. dysenteriae previously deprived of exotoxin and found that although the toxicity of such organisms was markedly reduced, they still possessed antigenic properties.

Method

Dried preparations of Kolle flask cultures of S. flexneri, type 1b were used. The organisms were washed with saline, centrifuged, dehydrated resp. killed with acetone and dried in an incubator. The carefully pooled yields were tested for toxicity and immunogenecity. The standard bacterial powder thus obtained served as starting substance in all the experiments. The preparations were stored at room temperature in an exsiccator. Both their toxicity and immunogenic capacity remained unchanged during the one year period of experimenting.

The *Boivin* extracts were prepared from the standard powder, according to the original method (1). To suspensions containing 40 mg of organisms per 1 ml, equal volumes of N/2 trichloracetic acid were added and the mixtures were stored at 2 to 3°C for 3 hours, then centrifuged thereafter dialysed and passed through Seitz filter. As a preservative, merthiolate 1 to 10.000 was added. During the one year period of storing in a refrigerator the extracts lost nothing of their toxicity and immunogenic activity.

After drying, some portion of the bacterial sediment was preserved and the rest re-extracted in the proportions specified. Extraction was repeated until precipitation tests revealed the presence of antigen in the extract. When antigen remainders were no longer detectable, extraction according to *Goebel* (4), with 50 per cent pyridine, was made. Twenty mg of the bacterial powder treated with trichloracetic acid were suspended in 1 ml of 50 per cent pyridine, extracted for 24 hours at 37°C, thereafter centrifuged and dried. This procedure of extraction was repeated five times. After removing the pyridine from the extract by means of dialysis, filtration and preservation were carried out according to the described method.Thus by the methods specified, bacterial sediments carried through 11 extractions (6 *Boivin* and 5 pyridine) and 12 different extracts were obtained.

Toxicity tests were carried out on groups of four mice each, injecting intraperitoneally bacteria and extracts, respectively, in a total volume of 0,5 ml. Toxicity is given in *LD50* values, calculated from 5 to 6 experiments, according to *Reed* and *Muench* (11).

Immunogenicity tests were performed on mice. The animals were immunized by a single intraperitoneal inoculation. 60 micrograms of the bacterial preparation, corresponding to about 100 million germs, or the equivalent amount of extract, 0,003 ml, were chosen for the standard immunizing dose. Immunity tests were carried out one week after immunization with living S. flexneri, type 1b, organisms of known virulence increased in mucin, stored in a lyophilized state. The results are given in *LD50* values.

Immune sera were obtained from rabbits. The animals were inoculated at four-day intervals with doses of 0,5, 1,0, 2,0 and 5,0 mg, respectively, of dry bacteria, or 0,05, 0,1, 0,2 and 0,5 ml respectively of the first *Boivin* extract. In absorption experiments weighed amounts of bacteria suspended in sera diluted 1 to 20 or equivalent amounts of *Boivin* extracts concentrated to 1/10 volume in a cellophane sac placed before a ventillator were used. Addition of the extract unavoidably diluted the sera. The shift thus caused was taken into account when evaluating agglutination results. The serum-bacterium mixture was kept at 37°C for 2 hours and stored in a refrigerator overnight. After intensive centrifugation the amount of agglutinin remainder was estimated by means of tube agglutination.

Precipitation tests involved total volumes of 0,5 ml, consisting of 0,4 ml of serially diluted antigen and 0,1 ml of immune serum diluted 1 to 5.

Table 1

Precipitation of S. flexneri 1b extracts, prepared by means of serial extractions

Method and number of extractions	Dilutions								
	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640
Boivin 1	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	−
Boivin 2	++++	++++	+++	++	+	±	−	−	−
Boivin 3	+++	+++	++	+	±	−	−	−	−
Boivin 4	+++	++	±	±	−	−	−	−	−
Boivin 5	++	+	±	−	−	−	−	−	−
Boivin 6	+	±	−	−	−	−	−	−	−
Pyridine 1	+++	++	+	±	−	−	−	−	−
Pyridine 2	++	+	±	−	−	−	−	−	−
Pyridine 5	±	−	−	−	−	−	−	−	−

Results

The results of the preliminary precipitation tests are shown in Table 1. It can be seen that with the increase in the number of extractions, the precipitation titres of the extracts were gradually decreased. While the first trichloracetic acid extract precipitated up to a dilution of 1 to 320, it was only in twofold dilution that the sixth extract showed a slight reaction. After treatment with pyridine, the titre of the first extract rose slightly, indicating that pyridine dissolved the somatic antigen more efficiently than trichloracetic acid. In consecutive extracts the precipitation titres decreased rapidly, with practically no precipitable antigen detectable in extract 5.

The spontaneous agglutination occurring in saline, or even in distilled water, after the third extraction, rendered agglutination results for extracted bacteria difficult to evaluate. Agglutination results remained unchanged after one or two extractions. Extracted bacteria were agglutinated up to a dilution of 1 to 10 000, corresponding to the titre of the serum, just as did untreated organisms. Trypaflavine agglutination tests were also made. Sensitivity to that substance was found to develop in the first extraction already. Thus, extracted organisms assumed the characteristics of R variants. These findings may be related to the elimination of the somatic antigen, as it will be discussed later.

In the following, toxicity and mouse protective power of bacteria and of extracts were estimated. In these studies organisms extracted with trichloracetic acid once and five times as well as bacteria subjected to 5 additional pyridine extractions were used. The first, second and sixth *Boivin* extracts as well as the eleventh pyridine extract have been subjected to tests.

Table 2

Toxicity and immunogenic capacity of the standard bacterium

Number of extractions	Toxicity LD 50		Immunizing activity		
	mg	%	Dose mg	LD 50	%
∅	0,85	100		10 000	100
1	2,00	43	0,06	2 600	26
5	3,00	28		760	8
10	5,80	15		50	0,5

Table 2 shows that after one extraction the toxicity rose from 0,85 mg to 2 mg, i. e. the first extract contained only 43 per cent of its original toxicity. In the further extracts the toxicity was reduced at a much lesser rate ; the first and fifth extracts differed only 15 per cent in toxicity and the LD 50 for mice of the fifth extract was 3 mg, i. e. 28 per cent of the original toxicity. Between the fifth and tenth extracts the difference in toxicity was 13 per cent.

After the tenth extraction the preparation was still toxic (LD50 5,8 mg), containing about 15 per cent of the original toxic activity for mice. Similar results were reported by *Perlman* et al. [15], who have found a 86 per cent decrease of bacterial toxicity after repeated extraction with pyridine.

Toxicity and protective power curves run parallel with one another, although the latter is at an about 15 per cent lower level than the former (Table 2). After one extraction the protection afforded by the arbitrary 60 mg immunizing dose dropped to ¼ of the initial value, being protective against an infective dose of 2600 LD50, in contrast to the 10 000 LD50 protection

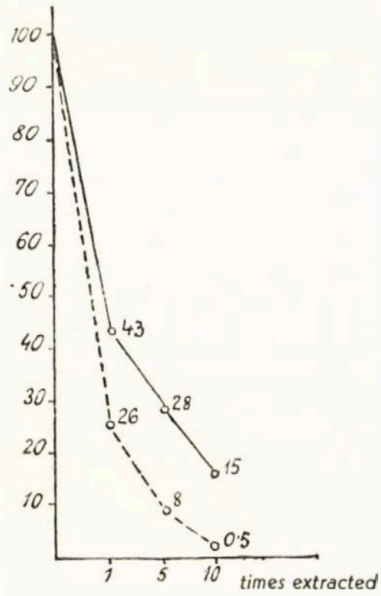


Fig. 1. Toxicity and protective value of S. flexneri subjected to serial extraction
———— = toxicity LD50, per cent
- - - - = protection LD50, per cent

offered by untreated organisms. After five extractions the protection was reduced to 8 per cent of the initial value. Following the tenth extraction 99 per cent of the initial immunogenic capacity had been removed and only traces of protection were left. In Figure 1. the parallel curves for reduction in toxicity and immunogenic capacity are shown, with the curve of immunogenic capacity running about 15 per cent lower than the one characterizing toxicity.

In Table 3, some informative data concerning the toxicity and immunogenic capacity of extracts are shown in terms of standard bacterial equivalents. E. g. the toxicity of the first extract in LD50 value is 0,075 mg, corresponding to 1,5 mg of the standard bacterial extract. This means that the toxicity of the extract amounted to 42 per cent of the bacterial preparation it had been

obtained from. Similar calculations revealed that 0,003 ml of the extract, equivalent to the arbitrary 60 μg standard bacterial immunizing dose, represented only 65 per cent of the immunizing capacity of the standard preparation. Thus, extract 1 was 42 per cent as toxic and 65 per cent as immunogenic as the standard bacterial preparation, instead of the 57 and 74 per cent values anticipated in view of the reduction in similar properties exhibited by bacteria once extracted (Table 2). Such variations inevitably occur in assays in which sensitivity of individual animals must also be taken into account. It must be noted that in consecutive extracts toxicity and immunogenity were reduced in an approximately identical measure. Clear-cut evidence to this point can be obtained by analyzing percentual values. E. g. the second extract possessed 14 per cent of the toxicity and 13 per cent of the immunogenic capacity of the standard bacterial preparation, while the corresponding values for the sixth extract were 7 and 8 per cent, respectively. Extract 11 was practically inactive.

Table 3

Toxicity and immunogenic activity of Boivin extracts, related to the standard bacterial preparation

No of extracts	Toxicity LD50			Immunogenic capacity			
	ml	Standard bact.		Dose ml	St. bact.x mg	LD 50	St. bact.x %
		mg	%				
1	0,075	1,5	42	0,003	0,06	6500	65
2	0,3	6,0	14			1365	13
6	0,6	12,0	7			800	8
11	1,50	30,0	?			40	0,4

x = values calculated in terms of standard bacterial preparation.

Taking the value of extract 1 as 100 and comparing the later extracts to it, the similarity in the rate of reduction of toxicity and antigenic capacity is even more striking. Apart from minor variations within the limits of error of the method used, toxicity and immunogenic capacity were reduced in an equal proportion. The values under discussion were 25 and 21 per cent in the second extract and both values amounted to 13 per cent in extract 6. Illustrative for this is Figure 2, showing the parallel curves of toxicity and immunogenic capacity. It follows that toxic and immunizing principles were extracted by trichloracetic acid to a similar degree, i. e. the toxicity of the *Boivin* extract may be used for estimating its immunogenic activity.

In Table 4 additional data illustrating the correlation between the toxicity and immunogenic activity of *Boivin* extracts are presented. It can be seen that one-tenth LD50 doses of extracts of different toxicity and immunogenic

capacity gave rise to a similar degree of immunity in mice, within the limits of error of the biological method.

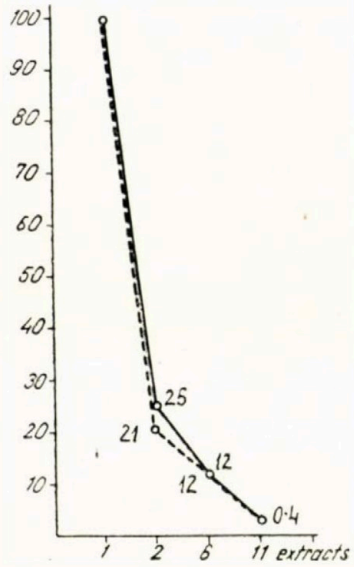


Fig. 2. Toxicity and protective value of S. flexneri extracts
——— = toxicity LD50, } (extract 1 = 100)
- - - - - - - = protection }

Table 4

Protection of mice immunized with 1/10 LD50 toxic doses of Boivin extracts

Immunizing material	Toxicity LD50	Immunizing dose	Protection LD50
1. Boivin	0,075 ml	0,0075 ml	13 600
2. «	0,3 „	0,03 „	10 200
6. «	0,6 „	0,06 „	11 500

The biological value of any material can be expressed by comparing its toxicity with its biological effect, i. e. in the given instance, by the ratio showing the number of immunization units per one toxic dose of the test material. For this ratio two values are required. One of them is the bacterial toxicity expressed in mg of LD50's and the other the amount protecting against 10 000 LD50 doses of living bacteria. In the case of whole bacteria this ratio was $\frac{0{,}85}{0{,}06} = 14$, i. e. one toxic dose contained 14 immunity units. The same value for bacteria subjected to a single extraction was 8, as calculated from the 2,0/0,24 ratio.

(The LD50 toxic dose was namely 2,0 mg and 0,24 mg protected against the infective dose of 10 000 LD50). Repeated extraction of the bacteria result in a diminution of the number of immunizing units per one toxic dose (Table 5), obviously because the immunogenic activity was being reduced at a higher rate than the toxicity. Evidence confirming this theory is supplied by the fact that after repeated extraction some toxicity still remains and a toxicity amounting to about 15 per cent of the original is practically uneliminable from the bacteria.

In the case of extracts, the ratio is more favourable. Reckoning with standard bacterial values, the first extract contains 16 immunizing units per 1 toxic dose (1,5 mg toxicity unit divided by 0,09 mg of standard bacterium protecting against 10 000 LD50) (Table 5). Very similar values are obtained in the third and sixth extracts (Table 5). This is in agreement with the observation that toxicity and immunogenic activity are reduced at a similar rate by extraction. According to these results, *Boivin* extracts are relatively more efficient immunizing agents than bacterial preparations. The bacterial cell contains, namely, a toxic component not eliminable by the method used and animal experiments revealed that this toxic component is antigenically inactive.

Table 5

Correlation between the toxicity of the standard bacterium and that of the Boivin extract, in relation to the standard bacterium, as well as its immunogenic capacity

Bacterium		Extract	
No of extractions	Immunizing unit content of 1 LD50	No.	Immunizing unit content of 1 LD50
∅	14	1	16
1	8	2	13
5	4	6	16
10	0,5		

One immunizing unit is the amount of test preparation giving rise after a single intraperitoneal inoculation to a protection against an infective dose of 10 000 LD50 in 7 days.

The results discussed are in close connection with the view that immunological processes are under the directing influence of a single factor, i. e. the somatic antigen bound to the bacterial surface, while other cell constituents are inactive in this respect. Although the reduction in the immunogenic activity of extracted bacteria and the simultaneous appearance of the immunity-inducing principle in extracts were findings attributable to the identity of isolated antigen with the somatic antigen of the whole bacterial cell, agglutination and protection experiments were also carried out in connection with quantitative cross absorption tests, in order further to elucidate this point. In the absorption experiments

25 mg of the bacterial preparation and equivalent amounts of *Boivin* extracts were used for absorbing 1 ml volumes of the 1 to 20 dilutions of immune sera prepared against standard bacteria, bacteria extracted ten times and *Boivin* extracts, respectively (Table 6). In the same series, the nature of toxic substance remaining in the bacteria after repeated extraction was also studied.

Table 6

Absorption studies

Serum against	Absorbed (25 mg/0,05 ml) with	Remaining aggl. titre against the standard bact.	Protective value of 0,01 ml of absorbed serum LD50
Standard and extracted bacterium (10 times)	∅	5120	25 000
	whole bacterium	40	∅
	Boivin extract	80	∅
	extracted bacterium	160	600
	extracted + hydr. + dial.	5120	25 000
Boivin extract	∅	5120	20 000
	whole bacterium	∅	∅
	Boivin extract	∅	∅
	extracted bacterium	40	∅

These experiments revealed the striking fact that the agglutinating activity of sera produced against bacteria extracted ten times equalled that of sera against intact bacteria. The protective activity of the former serum was not less than that of the latter. On the other hand, it could be anticipated that homologous bacteria or equivalent *Boivin* extracts would exhaust practically all the agglutinating and protective factors of sera against both standard and extracted bacteria. It could, however, not be expected that bacteria subjected to 10 extractions should also absorb intact and extracted bacterial antisera with only some low (1 : 160) residual titre left. The same bacteria that in active immunization experiments proved to possess only traces of activity, could also reduce the protective power of the sera to about a similar level (600 LD50). Antisera to *Boivin* extracts showed a similar behaviour indicating that the immunbiological principle in the *Boivin* extract was identical with that in intact bacteria. In other words, *Boivin* extracts qualitatively contain the complete somatic antigen of the intact bacterial cell.

It was assumed that absorption, agglutination and immunogenic properties of extracted organisms were connected with the non-extractible somatic antigen remainder. According to *White* [13], in the presence of somatic antigen the *Molisch* reaction is positive. With extracted organisms that reaction fell

out definitely positive although not markedly so. This was attributed to the presence of somatic antigen remainders. In order to eliminate these, *Boivin*'s experiment [8] was reproduced, assuming that by boiling in dilute acetic acid the surface-bound somatic antigen would be hydrolyzed. Ten times extracted bacteria were boiled in N/5 acetic acid for 3 hours. After this treatment the material was found to have lost all its immunogenic activity, with some of the absorptive activity still persisting. The *Molisch* reaction was still positive, indicating that carbohydrate cell constituents were still present. The material was then dialyzed for two days. By then, the *Molisch* reaction turned negative and the material lost its absorptive power simultaneously. It seems that the remainder of the somatic antigen was split into haptene molecules by hydrolysis and the consecutive dialysis eliminated these artefacts responsible for absorption. It should be pointed out that neither dialysis nor hydrolysis affected the residual toxicity, which amounted to about 15 per cent of the original.

Discussion

The present work was originally aimed at determining whether it was justified to use for immunization *Boivin* extracts prepared from S. flexneri instead of whole bacterial preparations. The experimental evidence accumulated is of both practical and theoretical significance.

As regards *theory*, new evidence has been obtained indicating that it is a single cellular component, i. e. the somatic antigen that directs, and is responsible for, serological and immune responses. The principle of S. flexneri, responsible for complement fixation and precipitation, and to which the production of agglutinins, precipitins, complement fixing and mouse protecting antibodies is due and which induces active immunity, has been found to be eliminable gradually by means of repeated treatment with trichloracetic acid and pyridine. Correspondingly, bacterial cells, the morphology and staining properties of which remained intact after extraction, retained only traces of their immunogenic activity. On the other hand, owing to antigen residues, they still showed agglutinogenic and absorptive activities and were about one-seventh as toxic as untreated organisms. These findings are in close agreement with the observations of *Gekker* and *Zhgutova* [18], according to which the nucleoprotein derived from S. flexneri possesses no immunogenic capacity. In view of the evidence obtained in the present experiments it appears likely that the immunogenic activity of the nucleoprotein isolated from S. flexneri by *Piccoli* [9] was due to contamination with traces of somatic antigen. The reduction in immunogenic activity was accompanied by spontaneous agglutination after 3 extractions and sensitivity to trypaflavine after a single extraction. Thus, extracted bacterial cells assumed the qualities which are usually characteristic

of R variants and are attributable to a quantitative modification of the somatic antigen. This factor was transferred into *Boivin* extracts. The R type change of morphologically intact cells is considered to be fresh evidence confirming the theory, according to which the somatic antigen is localized on the bacterial surface (*Belozersky* and *Gekker* [14], *Morgan* [15]).

The fact that extracts can give rise to active immunity equivalent to the one induced by intact organisms in proportion with the amount of somatic antigen they contain is considered as indicative that *Boivin* extracts are immunbiologically equivalent to whole bacteria. Evidence to this was obtained in agglutination tests carried out in connection with cross absorption experiments, in which intact and extracted bacteria, as well as *Boivin* extracts, were involved. Similar results have been reported by *Morgan* [15], *Smolens* [6] and *Perlman* [12]. Protection experiments also point in this direction. Only the identity of the *Boivin* extract antigen with the whole bacterial antigen can account for the fact that the protective capacity of a serum against whole organisms was completely neutralized by the *Boivin* extract, and vice versa.

The failure of repeated extractions to remove the total amount of somatic antigen is indicative of a close connection between somatic antigen and cellular structure. The same has been pointed out by *Boivin* and *Mesrobeanu* [8], who succeeded in extracting 65 to 75 per cent of the somatic antigen by three consecutive extractions and achieved complete elimination by a method consisting of a combination of trypsine digestion and treatment with trichloracetic acid. In agreement with these data we have found that a single extraction removes only 65 per cent of the somatic antigen and combined extractions with pyridine still leave some of the somatic antigen in the cells, to which the absorptive and antibody-producing capacities of the extracted cells are due. No other extraction method is absolute, either. *Morgan* [15] removed 80 per cent of the somatic antigen by means of three consecutive diethylene glycol extractions. Also *Goebel* [5] used repeated pyridine extractions.

It has been mentioned that organisms subjected to 10 extractions exhibited practically unchanged agglutinogenic and absorptive activities.-Judging from the positive *Molisch* reactions it appears likely that somatic antigen residues account for this paradox reaction. This is further supported by the finding that acetic acid hydrolysis and consecutive dialysis yield *Molisch*-negative cellular remainders, with a simultaneous disappearance of the absorptive and antibody-producing activities. It may be assumed that the rabbit is more sensitive to S. flexneri antigens than the mouse and this accounts for the fact that following repeated inoculations with extracted organisms highly protective agglutinating sera were obtained from rabbits, while the mouse sensitively indicated by a parallel decline in protection that the somatic antigen had been eliminated by the extraction. It is, however, also possible that in this instance the sum total of the antigenic actions of massive doses of bacteria used for immunizing

rabbits are compared with the slightly super-threshold doses employed for immunizing mice. Whichever the case, it seems justified to conclude that the mouse may prove a very sensitive test object in studies on Shigella immunity.

Beside the antigenically active cell component, the factor bound closely to somatic antigen and responsible for toxicity was also transferred into the *Boivin* extracts [16]. Trichloracetic acid dissolves toxic and antigenic factors in a similar measure. Therefore, the toxicity of the *Boivin* extract may be used for estimating its antigenic value. This observation may be of practical importance and calls for further research work along this line.

We have obtained evidence relative to the ambiguity of bacterial toxicity as well. The bacterial cell, deprived of its somatic antigen, retained approximately one-seventh of its original toxic capacity and this could not be reduced further even by means of acid hydrolysis, as already pointed out by *Boivin* [8], who reported that bacteria freed from somatic antigen by acid hydrolysis still remained one-eighth to one-tenth of their initial toxicity. This non-eliminable toxicity is probably bound to protein components of the cytoplasm and is equivalent with the toxic principle of R variants.

Of *practical* significance is in the first place the observation that the antigenic, or, more precisely, the immunizing capacity of the S. flexneri type 1*b* *Boivin* extract is somewhat more favourable than that of whole bacteria. *Boivin* extracts possessed namely a more favourable toxicity per immunogenic capacity ratio than did whole cells. For this the non-extractible toxic components of the whole bacteria cells are apparently responsible. This observation contradicts the data of *Smolens* et al. [6], who had found that the Flexner somatic antigen prepared by the HCl extraction method was more toxic and less immunogenic than whole organisms. It is very likely that the difference in results is attributable to the difference in methods used and the relation of immunogenic power to toxicity depends also on the method employed in isolating the somatic antigens, which suggests the independency of antigenic and toxic principles of the somatic antigen [16].

It can also be concluded that *Boivin* extracts possess antigenic properties comparable to those of whole bacteria. It can be brought up as a disadvantage of the method that a better than 80 per cent yield of somatic antigen cannot be obtained even by repeating the extraction twice. Compensating this unavoidable loss in antigen are the favourable *antigenicity/toxicity ratio*, *the colloidal state* and the *low contents in ballast substance* of the extract. Ill-defined, immunobiologically worthless cellular components may namely give rise to allergic reactions that in their turn are mainly responsible for the untoward symptoms developed after inoculation *(Zdrodovsky* [17]). The colloidal state renders a further reduction of toxicity by means of purification and absorption possible. Work along this line may bring us nearer to the solution of the problem of immunizing against dysentery.

SUMMARY

(1) Studies on *Boivin* extracts of S. flexneri, type 1b, prepared by repeated extraction, and whole S. flexneri, type 1b organisms, have been carried out and the immunobiological properties and the toxicity of the extracts were compared with those of the organisms used in their preparations.

(2) Approximately 57 per cent of the toxicity and 74 per cent of the immunogenic capacity were removed from bacteria by a single extraction. In consecutive extractions a parallel diminution in both toxicity and immunogenic capacity was observed, with the curve of the immunogenic capacity running at a level about 15 per cent lower than the one of toxicity. After ten consecutive extractions a 99 per cent drop in protective value and an about 85 per cent diminution in toxicity were found, indicating that it was not possible to remove a certain part of the toxic capacity.

(3) The extracts were mirror images of bacteria. The first extract contained 65 per cent of the protective capacity and 42 per cent of the toxicity of intact bacteria. Protecting and toxicity factors were transferred into consecutive extracts in a similar degree indicating that the toxicity of the extract may serve as a basis for estimating its immunogenic activity.

(4) The *Boivin* extract has proved to be an immunizing agent qualitatively superior to the whole bacterial cell, since the former contained more immunizing units per one toxic unit than the latter, apparently in consequence of the presence of a non-extractable toxic factor other than the one of the somatic antigen. This toxic factor is suggested to be a genuine property of the bacterical cytoplasm.

(5) The similarity of the results of agglutination and protection experiments carried out within the framework of absorption tests, as well as the qualitatively similar protection induced by the two types of preparations, are thought to indicate that the antigen in the extracts is identical with the *in situ* somatic antigen.

(6) After ten extractions the cells still contain remainders of the antigen responsible for agglutination and absorption which can be removed by means of acid hydrolysis and dialysis.

(7) Morphology and staining of the cells are unaffected by the disappearance of the somatic antigen on extraction. On the other hand, there develop a sensitivity to trypaflavine and a tendency to spontaneous agglutination, characteristic of R variants. All these findings are thought to be another evidence indicating that the somatic antigen is localized on the surface of the bacterial cell.

(8) In consequence of its antigenic properties, colloidal state and low content in ballast substance, the *Boivin* extract as an immunizing agent is considered to be superior to whole bacteria.

LITERATURE

1. *Boivin A., Mesrobeanu L.:* Rev. d'Imm. **1**, 553 (1935).
2. *Raistrick H., Topley W. C. C.:* Brit. J. Exp. Path. **15**, 113 (1934).
3. *Morgan, W. T. J.:* Bioch. J. **30**, 909 (1936); **31**, 2003 (1937).
4. *Morgan, W. T. J., Schütze H.:* Lancet **3**, 284 (1943).
5. *Goebel W. F., Binkley F., Perlman E.:* J. Exp. Med. **81**, 315 (1945).
6. *Smolens J., Halbert S. P., Mudd S., Doak B. W., Gonzalez L. M.:* J. Imm. **52**, 41 (1946).
7. *Rauss K.:* Népegészségügy 1947 No. 51; Orvosi Hetilap **94**, 1093 (1953).
8. *Boivin A., Mesrobeanu L.:* Rev. d'imm. **2**, 113 (1936).
9. *Piccoli M.:* Magyar Orvosi Archivum **42**, 133 (1943).
10. *Rédey B.:* Personal communication.
11. *Reed L. J., Muench H.:* Am J. Hyg. **27**, 493 (1938).
12. *Perlman E., Goebel W. F.:* J. Exp. Med. **84**, 223 (1946).
13. *White P. B.:* J. Path. Bact. **30**, 113 (1927).
14. *Белозерский, А. Н., Геккер, В. Д.:* Доклады Акад. Наук **59**, 763 (1948).
15. *Morgan W. T. J.:* The nature of the Bacterial Surface, pp. 14,15, 13. Blackwell, 1949.
16. *Tal C., Goebel W. F.:* J. Exp. Med. **92**, 25 (1950).
17. *Здродовский, П. Е.:* Микробиология 1950, No. 6.
18. *Геккер, В. Д., Жгутова, В. В.:* Доклады Акад. Наук **59**, 42 (1948).

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ТОКСИЧНОСТИ И ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКОМУ ДЕЙСТВИЮ *SHIGELLA FLEXNERI* И ЕГО ИЗОЛИРОВАННОГО СОМАТИЧЕСКОГО АНТИГЕНА

К. Рауш и И. Кетьи

Резюме

1. Исследовалось и сопоставлялось иммуногенное действие и токсичность экстрактов Боавена приготовленных повторным экстагированием палочки Флекснера типа 1б и бактерий из которых приготовляли экстракты.

2. После первого экстрагирования токсичность бактерий была уменьшена приблизительно на 57%, а иммунобиологическое действие на 74%. В течении следующих экстрагирований оба показатели уменьшались параллельно с разницей приблизительно на 15%. После 10 экстрагирований иммунобиологическое действие снизилось на 99%, а токсичность на 85% ; согласно этому некоторую часть токсичности нельзя экстрагировать.

3. Экстракты отражают состояние бактерий. Первый экстракт содержал 65% иммунобиологического действия нормальной (нетронутой) бактреии и 42% ее токсичности. После того оба показатели снижались в совершенно одинаковой степени, т. е. перешли в следующие экстракты. Таким образом токсичность может служить показателем иммуногенного действия экстракта.

4. Иммунизирующий фактор экстракта качественно немного выше, чем бактериальная клетка, потому что токсическая единица экстракта содержит больше иммунизирующих единиц, чем бактерия. Это свойство бактерий нельзя извлекать ; его можно объяснить токсичностью независящей от соматического антигена и можно считать генуинным признаком цитоплазмы.

5. На тождественность экстрагированного антигена и соматического антигена in situ указывают качественно одинаковое иммуногенное действие, а также и эксперименты с перекрестной агглютинацией и иммунизацией.

6. После 10 экстрагирований в клетках еще можно обнаружить агглютиноген и остатки антигена с абсорбирующем действием. Их можно устранить кислотной гидролизацией и диализацией.

7. Соматический антиген, удаленный действием экстрагирования не оказывает вредное действие на морфологические свойства и окрашиваемость клеток, но приводит к трипафлавиновой и спонтанной агглютинации, которые характерны для варианта R. Все это свидетельствует о поверхностной локализации соматического антигена.

8. Экстракт Боавена является более пригодным для иммунизации, чем цельная бактерия, благодаря качеству его антигена, коллоидальному состоянию экстракта и малому количеству содержащихся в нем балластных веществ.

ISOLATION OF INFLUENZA C VIRUS IN HUNGARY

By
E. FARKAS and I. DÖMÖK

State Institute for Public Health, Budapest

Received July 9, 1953

During January and February, 1953, an influenza epidemic occurred in Hungary, extending to all areas of the country. In most areas it broke out suddenly, morbidity rose high, but the disease took a mild course. Other papers to be published in the near future will deal with the epidemic itself and with the virological studies carried out in connection with it. Suffice here to mention that 11 influenza B and 1 A-prime strains were isolated duri ng the epidemic. Tests made with several pairs of sera and a great number of convalescent sera revealed that the influenza B virus played the most important part in the outbreak.

In the present paper the isolation, at the beginning of the outbreak, of a strain from a patient with mild influenza is reported. This strain differs from those mentioned above. Its properties to be described let us conclude that except a few insignificant features it is identical with Taylor's strain 1233. The latter was isolated in 1947 from the throat of a patient suffering from mild influenza, during a New York epidemic [1], in which, however, the influenza A-prime virus was the predominant causative agent. Since then 3 papers have been published reporting the isolation of strains nearly identical with Taylor's 1233 [2, 3, 4]. Common in the history of these strains is that they were isolated from mild cases, always at a time when simultaneously an influenza epidemic caused by another type of virus was present and that all the isolations were made in the United States of America. In one of the papers [4] the isolation of 14 similar strains is reported. *Francis* et al. [2] suggested the name »Influenza C« to denote Taylor's 1233 and similar strains. This suggestion has been adopted by most authors. *Hirst*, however, rejected it [5], since it is not only in its antigenic properties that this virus differs from the others, but also in cellular receptors. In the present paper, joining the majority of authors, the virus under discussion will be termed »Influenza C«, without thereby taking sides in the dispute.

Materials and methods

Strains of Virus. Of the strains used for comparative studies, PR8 and Lee originated from the State Serum Institute, Copenhague, the influenza A-prime, Paris P. L. 1/49 and England 1/51 (in the text : Liverpool), as well as Taylor's 1233 strains from the World Influenza Centre. In this laboratory, the PR8 strain was carried through 53, the Lee strain 44, the Paris strain 21

and the Liverpool strain through 10 allantoic passages, while strain 1233 through 3 amniotic passages. The influenza A-prime Budapest 4/49, the influenza B Budapest 5/53 and 6/53 strains were isolated in this laboratory and were carried through 32, 5 and 5 egg-passages, respectively. In the text Bp instead of Budapest.

Virus Isolation Experiments. Throat washings were obtained by gargling with 15 ml of saline. An equal volume of broth was immediately added to each gargling and the mixture was placed in dry ice (−70°C) for two days. After rapid thawing 2000 units of penicillin and 2 mg of streptomycin were added to each 1 ml of the mixture and 0,1 ml of each material was inoculated into the amniotic sac of 8 eight-day old and 3 eleven-day old embryonated eggs. The eggs were incubated at 38°C prior to, and at 35,5°C after, inoculation. Allantoic and amniotic fluids were harvested in the first and second passages in the 96th, in the 3rd and 4th passages in the 72nd hour and in later passages in the 36th to 48th hour following inoculation. Before harvesting the eggs were cooled for 4 to 5 hours in a refrigerator of + 4°C. Blind passages were carried out with amniotic fluid diluted with saline 1 to 100, or in some instances, to 1 to 2. The dilutions of the RM strains used in the third and fourth passages are shown in Figure I. In later passages 10^{-3} dilutions of amniotic fluid were used.

Erythrocytes. — Blood was obtained by puncturing the wing vein from chicken, the jugular vein of sheep, by decapitating from sparrows, canaries, parakeets and frogs, and by heart puncture from other species. Blood samples were immediately mixed with 1/5 volume of 3,8 per cent sodium citrate ; the red cells were washed with saline four times.

Immune sera. Syrian hamster and ferret immune sera were used. In some instances the animals were immunized intranasally but more frequently immunization was carried out by injecting intraperitoneally at weekly intervals three doses of 1,5 ml each of amniotic or allantoic fluid of a HA titre of about 1 to 1000. Blood was withdrawn from the heart on the 7th day following the last inoculation. After inactivating at 56°C for 30 minutes, sera were stored at + 4°C. The materials were usually tested within a period of one month. Human sera were inactivated in a similar way. After inactivation, merthiolate in an end-concentration of 1 to 10 000 was added to human samples.

Haemagglutination (HA) test. Takátsy's loop-dilution method [6] was used. Into the grooves of plexiglass plates 0,025 ml volumes of a 1 per cent red cell suspension were measured by the aid of an instillator. Using the 0,025 ml volume loop, the virus was diluted in the red cell suspension. The plates were then placed into a refrigerator and kept at 4°C. Results were estimated by the sedimentation pattern method after 20 minutes for nucleated red cells and after 40 to 45 minutes for mammalian red cells, unless stated otherwise. Slide HA tests were also performed. To 0,025 ml of undiluted virus on the slide, 1 normal loopful of packed red cells was added and the slide was slowly shaken.

Haemagglutination inhibiton (HI) test. This test was also carried out with *Takátsy's* method. To 0,025 ml volumes of twofold dilutions, 0,025 ml of the viral suspension containing 4 HA units were added. After standing at room temperature for 10 minutes, 0,025 ml of the 1 per cent red cell suspension were also added to each mixture. The diluent was simple physiological saline. The viral dilution containing 4 HA units was determined by means of titrations employing the same volumes as those used in the main experiment.

Complement fixation (CF) tests. According to *Takátsy's* [6] method, on grooved plexiglass plates 0,025 volume dilutions of sera were made by means of the loop. To each dilution a single 0,025 ml drop of the antigen-complement mixture prepared immediately prior to use and containing 4 units of antigen and 3 units of complement was added. As antigen, amniotic or allantoic fluids were used. After mixing,the plates were incubated at 37°C for 20 minutes and the sensitized red cell suspension containing 4 haemolytic units and 2,5 per cent of sheep erythrocytes was added to the mixtures. Readings were taken after another 20 minutes of incubation at 37°C.

Neutralization tests. The mixture consisting of diluted serum and 1000 infective units of virus per 0,1 ml was allowed to stand at 4°C for three hours. 0,1 ml of this mixture was inoculated into embryonated eggs. In the case of influenza C virus, amniotic inoculations were made, in other instances the material was injected into the allantoic sac. A saline solution containing 10 per cent of normal rabbit serum was used as diluent. Prior to inoculation the embryonated eggs were incubated at 38°C for 10 to 11 days. After inoculation the eggs were kept at 35,5°C for two days, then cooled at 4°C for 4 to 5 hours. The harvested amniotic and allantoic fluids were subjected to HA tests, in case of influenza C virus with rat erythrocytes, otherwise with chicken red cells.

Experimental

Recovery of the RM strain. The new influenza C strain has been isolated from the throat of patient R. M., in the town Esztergom, near the northern frontier of the country. The throat washing was taken on the 15th of January. At that time the epidemic had been active for a week and had reached its peak in Esztergom and its surroundings, while in Budapest the first cases were being reported. Other parts of the country were still free from the disease.

R. M., a 16 year old girl, was the inmate of a college in Esztergom. There were 280 girls in the college, all of them between 14 and 18 years of age. The epidemic broke out abruptly on the 9th of January and by the 15th of that month, 60 patients were confined to bed. The actual number of bedridden patients on the 15th of January amounted to 24, with 20 of them exhibiting symptoms of influenza. Characteristic of the disease were the sudden onset, shivering, chills, a temperature rarely exceeding 39° C, intensive headache, dizziness and nausea. In some cases vomiting, and in one case epistaxis responding poorly to treatment were also observed. A sore throat was a common complaint, with the inflammation not involving the hard palate. Coryza and marked respiratory symptoms developed in 5 cases, but the onset of coryza was not always simultaneous with the appearance of other symptoms. Most of the patients recovered in 3 to 6 days, a few, however, had two attacks within a period of 2 to 3 weeks.

R. M. herself developed coryza on the 12th of January, with a severe cough on the 14th. On the 15th, the day of observations, she complained of vertigo, nausea, sore throat and pain in the right ear in the morning. On examination a pulse rate of 90 per minute, a slightly inflamed throat with somewhat swollen tonsils, but no other symptoms were found. No significant change in her condition occurred before the 18th of January, her temperature never exceeded 38° C. On the 19th she made a complete recovery.

On three occasions, on the 15th and 29th of January and on the 16th of February blood samples were taken from R. M. and her 12 fellow patients. Throat washings were also secured from 8 patients and attempts were made to recover the virus. Amniotic and allantoic fluids from eggs inoculated with the throat washings agglutinated neither guinea pig, nor chicken red cells. Blind passages with pools of 2 to 3 amniotic fluids were also made with each material. Seven of the blind passages gave negative results and the virus could not be recovered but from the throat washings of R. M. The scheme of the first four passages is presented in Fig. 1.

Guinea pig red cells were agglutinated by none of the fluids. In the 2nd and 3rd passages, the chicken red cell agglutination was irregular, being more marked once in the amniotic, at other times in the allantoic fluid. From the 4th passage on, the amniotic fluids showed a high HA titre to chicken red cells

(from the 5th passage, 1 to 1000), while the allantoic fluids were either negative or agglutinated at a dilution of 1 to 64 or lower. The average egg-infective titre of the amniotic fluids was 10^{-8}.

Serological characteristics of the RM strain. In neutralization, CF and HI tests the strain gave no cross reactions with the influenza A (PR8), A-prime (Paris, Bp 4/49), and B (Lee, Bp 5/53) viruses. NDV and mumps anti-sera did

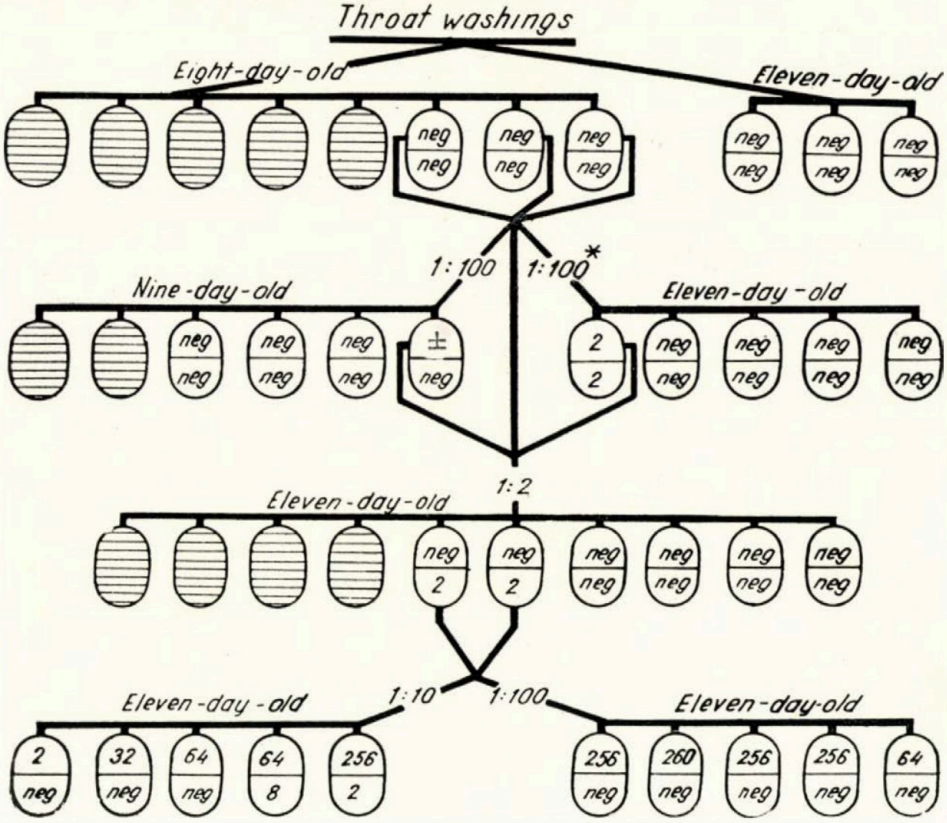


Fig. 1. The first four passages of the R. M. strain Dilution of inoculum. In the ovoids, above, reciprocal values of HA titre in amniotic fluids, below, those in allantoic fluids.

not neutralize the virus, nor did they inhibit its haemagglutinating action. In cross CF and HI tests, on the other hand, the RM virus proved nearly identical with Taylor's strain 1233, as shown by the results tabulated in Table I.

HA properties of the RM strain. As pointed out above, the RM strain agglutinated chicken erythrocytes, but not guinea pig red cells. In slide HA tests the RM amniotic fluid, undiluted or in low dilutions, made chicken erythrocytes to agglutinate in clumps within a few seconds, while in higher dilutions agglutination was slower and finer in type. Further data on HA are summarized in Table II.

Table I

Cross HA Inhibiton and Complement Fixation Tests

Serum	Complement fixation titers with antigen		HA inhibition titres to strain	
	1233	RM	1233	RM
Hamster anti-1233	64	128	192	256
Ferret anti-1233	128	128	192	96
Hamster anti-RM	512	512	256	384
Ferret anti-RM	128	128	128	128

Table II

Haemagglutination Properties of the RM strain

Donos of red cells	Temperature	Time of reading	Degree of Ha with dilution of virus						
			1 : 3	1 : 9	1 : 27	1 : 81	1 : 243	1 : 729	1 : 2187
Chicken	4° C	20 min.	+	+	+	+	±	—	—
Chicken	4° C	40 «	—	±	±	+	±	—	—
Chicken	20° C	20 «	—	—	—	—	±	—	—
Chicken	20° C	30 «	—	—	—	—	—	—	—
Chicken	25° C	20 «	—	—	—	—	—	—	—
Sparrow	4—20° C	20 «	++	++	++	++	++	++	±
Frog	4—20° C	20 «	++	++	++	++	++	±	—
Parakeet ...	4—20° C	20 «	++	++	++	±	—	—	—
Canary	4° C	20 «	+	+	+	+	+	+	±
Canary	4° C	40 «	—	—	—	+	+	+	±
Hamster	4° C	40 «	+	+	+	+	+	±	—
Rat	4—20° C	40 «	+	+	+	+	+	±	—
Mouse	4—20° C	40 «	+	+	+	±	—	—	—
Man 0	4° C	40 «	±	±	±	±	±	±	—
Man 0	20° C	40 «	—	—	—	—	—	—	—
×	4—20° C	20—40 «	—	—	—	—	—	—	—

— = no HA
± = very fine agglutination
\+ = no clumps visible to the naked eye are formed
++ = formation of rough clumps
× = dog, cat, guinea pig, ferret, rabbit, sheep, pigeon

Performing the HA titration in a refrigerator, 20 minutes after mixing chicken erythrocytes were agglutinated without zone-phenomenon. After prolonged standing at 4°C HA ceases gradually, first in the grooves containing lower dilutions of the virus, 40 minutes after mixing only a zone-like HA is seen. The zones appeared to be even more restricted when titration was carried out at 20°C and the reading taken 20 minutes after mixing. The upper limit of the positive zone is approximately identical with that of cold agglutination. At room temperature even this zone-like haemagglutination ceased 25 to 30 minutes after mixing. At temperatures higher than 20°C agglutination of the chicken red cells ceases prior to sedimentation.

The agglutination of rat, mouse, sparrow, parakeet and frog red cells was more stable even at room temperature, while Syrian hamster and canary red cells showed an agglutinability similar to that of chicken erythrocytes. Even more labile than that of chicken erythrocytes was the agglutination of O type human red cells. Ferret, cat, guinea pig, sheep and pigeon red cells were not agglutinated at all by the RM strain.

The high variation in the HA titres of the same material to red cells of different species was striking. Data in Table II show that the most sensitive indicator of the presence of virus was the agglutination of sparrow red cells. Rat or frog red cells are easy to obtain and give reliable results. Rat red cells have the disadvantage of showing a tendency to spontaneous agglutination. The clumpy agglutination type shown by red cells of stable agglutinability was especially marked with the red cells of the frog and parakeet.

It is known that at room temperature or at higher temperatures the influenza virus-induced HA is not stable. This is thought to be due to the fact that the virus adsorbed onto during haemagglutination is soon eluted from the surface of the red cells. In the following experiment it was endeavoured to find out whether the above discussed lability of chicken red cell agglutination was due to a similar mechanism. Chicken red cells of labile, and rat red cells of stable agglutinability were employed in the experiments. A mixture of amniotic and allantoic fluids with a titre of 1 to 128 to chicken red cells were cooled in melting ice. To samples of the fluids 2, 4, 8 and 12 per cent chicken or rat red cell suspensions, respectively, were mixed in equal volumes. After standing in melting ice for 10 to 60 minutes, the iced samples were centrifuged at 2500 r. p. m. for 5 minutes. The HA titres of the supernatants are shown in Table III.

It can be seen from Table III that approximately one-half of the virus remains in the supernatant even with 6 per cent chicken red cells. Still less was adsorbed by the 2 per cent suspension. On the other hand, the 2 per cent rat red cell suspension adsorbed the total quantity of virus. The difference between the results of the 10 and 60 minute experiments was not significant.

Table III

Adsorption of RM virus onto chicken and rat red cells

Red cell specimen	Red cell concentration per cent	Duration of incubation at 0°C	HA titre of supernatant
—	—	10 minutes	1 : 128
—	—	60 «	1 : 128
chicken	2	10 «	1 : 96
chicken	2	60 «	1 : 96
chicken	6	10 «	1 : 64
chicken	6	60 «	1 : 64
rat	1	10 «	1 : 8
rat	1	60 «	1 : 16
rat	2	10 «	1 : 2
rat	2	60 «	1 : 4

In further studies it was revealed that from red cells saturated with virus at a temperature of 37° C the virus was eluted almost completely within a period of 15 minutes. This was valid for both rat and chicken red cells. At 20° C, during 15 minutes the virus was eluted from the latter only, while with the former, elution was not complete even after 30 minutes.

Thus, similarly as in the case of influenza A and B strains, a certain parallelism could be observed between the stability of agglutination, on the one hand, and that of adsorption, on the other. The zone phenomenon presenting itself in HA titration may well be attributed to the fact that the virus receptors are more rapidly destroyed by the more concentrated virus.

The theory of receptor-breakdown was substantiated in the following experiment. Influenza A (PR8), A-prime (Liverpool), influenza B (Bp. 6/53), RM and 1233 virus dilutions of the same HA titre of 1 to 400 were mixed to rat red cell suspension by adding to 5 ml of the diluted virus suspension 5 ml of a 1 per cent rat red cell suspension. After incubating for 3 hours at 37° C the red cells were centrifuged, washed with 30 ml of saline, the supernatant discarded and the sediment taken up, in 5 ml of saline. 0,5 ml of the diluted sediment was pipetted into each of 7 tubes. Into each tube one of the above mentioned viral suspensions was added, to the 6th tube 0,5 ml of a 1 to 200 dilution of Lee virus, to the 7th an equal volume of saline. Cooled reagents were used. Results are shown in Table IV.

The crosses in Table IV represent the degree of agglutination. Although agglutination of a minor degree occurred in some controls devoid of virus, it is still evident that red cells treated with influenza A, A-prime and B strains, respectively, could not be reagglutinated by these viruses, but were agglutinable

Table IV

Agglutinability of rat red cells pre-treated with 5 different strains of influenza virus

Agglutinating strain	Pre-treatment strain					
	PR8	Liverpool	Budapest 6/53	1233	RM	–
Infl. A PR8	–	–	±	++++	+++	++++
Infl. A'Liverpool	–	–	±	++++	++++	+++
Infl. B Lee	–	–	+	++++	++++	++++
Infl. B Budapest 6/53 .	+	–	±	++++	++++	++++
1233	++	++++	++++	–	±	++++
RM	++	++	+++	–	–	+++
–	–	–	±	–	–	–

by strains RM and 1233. Red cells treated with the two latter strains were no more agglutinable by these two strains, but could be agglutinated with the influenza A, A-prime and B viruses.

It has also been found that the loss in agglutinability runs parallel with the diminution of the adsorptive power of red cells.

The experiment indicate that the cell receptors of the RM strain are either identical with, or are very similar to, those of the strain 1233, while, as stated by *Hirst* [5] for strain 1233, they differ from the receptors of influenza A, A-prime and B. Thus, we agree with *Hirst* in concluding that neither the 1233, nor the RM strain fit into the receptor gradient of *Burnet* [7].

During storage at +4° C for 30 days the HA titer of the RM amniotic fluid was reduced to 1/9 the original. The haemagglutinin of the strain showed an unusually high resistance to heat. After 30 minutes at 70° C no appreciable loss occurred in the HA titre and the heat-treated virus caused an even more stable chicken red cell agglutination than the untreated virus. After 30 minutes at 75° C the fluid lost its capacity to agglutinate chicken red cells, while it maintained about 1/8 of the original haemagglutinating power to rat red cells. After 30 minutes at 80° C in the virus infected amnion fluid a rough precipitate separated that remains insoluble after cooling. No haemagglutinin could be detected in the clear supernatant after sedimentation.

In similar experiments the heat resistance of strain 1233 did not differ from that of the RM strain.

Pathogenicity of RM strain. Attempts were made to infect Syrian hamsters and ferrets by nasal instillation of material from the 5th passage of the RM strain. No characteristic clinical or pathological changes developed. Experiments will be carried out to determine whether the variations in body temperature, which sometimes slightly exceeded the normal limits, or the presence of mild lung lesions, were in any way connected with the infection.

The virus did not kill ten to eleven day old chicken embryos during a four day period of incubation. Apart from a slight reduction in the amount of amniotic fluid, no gross changes could be detected in the embryonated eggs.

Concentration and purification of the virus. Incomplete adsorption of the virus to chicken red cells renders these cells unsuitable for concentration of the RM strain. With rat erythrocytes, on the other hand, a tenfold concentration of the virus can be achieved without appreciable loss. The suitable concentration of the rat red cell suspension varied between 2 to 4 per cent, depending on the HA titre of the embryonal fluid used. At 0° C, adsorption is complete in 15 to 20 minutes, while the time required for elution amounted to 30 minutes at 37° C.

A simple but reliable method of concentration and purification that proved to be of value in preliminary trials is the following. Two to fourfold dilutions are made from the RM amniotic fluid, at a temperature of +4° C, using distilled water as a diluent. The precipitate separated is sedimentable by centrifuging at 8000 r. p. m. for 10 minutes. The settled precipitate, readily soluble in saline, contains nearly the total haemagglutinating activity of the amniotic fluid.

The method is illustrated by the following example. 5 ml of amniotic fluid of a HA titre of 1 to 800 was diluted with 10 ml of distilled water. The precipitate was taken up in 1 ml of saline. The HA titre of the suspension thus obtained was 1 to 3200. More than fourfold dilutions with distilled water result in inactivating the viral haemagglutinin.

The principle of this method is the same as in *Takátsy*'s procedure [8, 9] for influenza A and B, NDV and mumps viruses. The only difference is that the latter four viruses are precipitated not from embryonal fluid, but from the red cell eluate. The degree of purity and the infectivity of the precipitate have not been determined.

The Role of Influenza C virus in the 1953 Epidemic in Hungary. At first the immune response of R. M. and her 12 fellow patients were determined. CF titres against antigens prepared from RM and influenza B strains, respectively, are shown in Table V. The influenza A titres are not shown, since these underwent no appreciable change in the course of the actual illness or during convalescence in any of the patients.

The results illustrate that in the period between the first and second blood samplings the antibody titres of R. M. and those of two other patients rose to 16 to 64 times the initial value. Between the 2nd and 3rd samplings the serum titres of 4 additional patients rose to levels four to eight times the initial, while during the same period in one patient the high titre returned to the original level. The results of haemagglutination inhibition tests and, in the case of the first 3 sera shown in Table V, also those of neutralization tests, are tabulated in Table VI. The results are indicative of a very close correlation.

Table V

Complement fixation titres to influenza C and influenza B of 3 samples of sera from each of a total of 13 patients

Name	Titre to influenza C of sample			Titre to influenza B of sample		
	1	2	3	1	2	3
R. M.	4**	64	32	—	—	4
B. E.	—*	128	128	32	256	256
H. I.	8	128	4	—	4	32
U. M.	4	4	16	64	16	32
L. A.	8	8	8	—	4	4
R. T.	4	4	4	—	4	16
Z. K.	—	—	—	—	128	32
M. P.	—	—	16	—	8	8
K. J.	8	8	4	—	4	64
F. M.	4	4	16	—	8	8
G. J.	—	—	—	16	32	32
É. P.	4	4	∅	4	64	∅
H. E.	16	16	32	—	32	64

—* = < 4

** = Reciprocal value of the highest dilution giving an at least ++ complement fixation

∅ = not tested

Table VI

Serological titres of sera of 3 patients from the student's home mentioned in the text

Serum		Anti-RM titres			Complement fixing titre to influenza B
		Neutralization	CF	HI	
R. M.	1.	15*	4	8	<4
	2.	140	64	128	<4
	3.	160	32	96	4
H. I.	1.	40	8	<2	<4
	2.	>800	128	128	4
	3.	25	4	12	32
B. E.	1.	< 10	<4	<2	32
	2.	>800	128	256	256
	3.	∅	128	128	256

* = reciprocal values

It is not shown in Table VI that the results of parallel tests carried out with antigens prepared from the RM and 1233 strains and human sera were very similar to each other.

Seven of the 13 patients showed a marked rise in the titre to influenza B, indicating that the influenza C virus cannot be considered to be the only causative agent responsible for the outbreak in the college. Considering, however, that 3 of the patients exhibiting a rise in titre to influenza C gave no serological response to either influenza A, or influenza B, it seems that in these cases the influenza C virus was the causative agent.

During and after the epidemic more than 2000 sera were subjected to complement fixation tests against influenza A, B, and C antigens. More than a hundred pairs of sera were also tested. A detailed account of these examinations will be published in another paper [10]. Suffice to mention here that in the overwhelming majority of cases the influenza B virus was the causative agent. Apart from the Esztergom cases a significant rise in the titre to influenza C virus, or complement fixation titres of 1 to 64 or higher, were only rarely found. Although in other areas the number of positive results was small, it nevertheless indicates that during the epidemic influenza C virus was present also in areas other than that of Esztergom.

Discussion

During the 1953 influenza epidemic in Hungary influenza C virus could be recovered from a patient with mild influenza. Since isolation of this virus has been reported only from the United States of America, the finding is considered the first isolation of this virus in Europe. The finding also indicates that, similarly to the other types of influenza virus, this type has also been established in areas distant from each other.

The origin of the virus from patient R. M. appears to be proved, since during the illness the influenza C antibody titre rose considerably in the serum of the patient. The possibility of a laboratory contamination must be rejected, since at the time of isolation there was no influenza C strain at the laboratory. The causative rôle of the virus has not been confirmed when in the course of the illness a rise in the titre to influenza B could also be detected. In 3 patients, however, only the titre to influenza C showed a significant rise. Some patients had a history making it probable that a two-phase course had taken place, one of which could have been an infection with influenza C, the other with influenza B, but the clinical observation was not thorough enough to allow definite conclusions. According to the reports published, influenza C virus has always been isolated during epidemics caused by other types of the virus, in 3 cases by influenza A-prime, in one case by influenza B.

The RM strain seems serologically identical with Taylor's strain 1233 to which it bears a striking resemblance also in other characteristics. A marked difference between the two strains is the fact that chicken red cells are agglutinated more stably and in a relatively high titre by strain 1233 than by the RM strain. The difference may be due to the far greater number of egg passages the 1233 strain had been carried through.

We have found no data in the literature on the HA spectrum of influenza C. Our statement concerning this point leads to the practical conclusion that in the course of virus isolation it might be useful to carry out haemagglutination tests also with sparrow red cells, these being more sensitive than chicken erythrocytes.

On basis of the HA spectrum we have worked out a rapid method of tentative typing of the slide HA test type, which consists in adding to three drops of the amniotic fluid rat, guinea pig and sheep red cells, respectively. Illustrative of the method is Table VII.

Table VII

Slide haemagglutination for the tentative determination of influenza virus strains

Virus	Red cell		
	rat	guinea pig	sheep
Influenza A-prime	+	+	−
Influenza B	±	++	+
Influenza C	++	−	−

Hirst [5] had stated that the cell receptors of strain 1233 were not identical with those of other types of influenza virus. We could confirm and extend this finding to strain RM. The unusually high resistance to heat of the influenza C haemagglutinin is a further evidence indicative of the difference between haemagglutination properties of influenza C, on one hand, and those of influenza A and B, on the other.

SUMMARY

1. In January 1953, at the beginning of an influenza B epidemic extending to the whole of Hungary, influenza C virus could be recovered from the throat of a patient suffering from mild influenza. This strain is, to our knowledge, the first influenza C strain that has been isolated in Europe. The characteristics of the new strain are essentially identical with those of Taylor's 1233 strain.

2. The human origin of the strain is without doubt in view of the specific immune responses. Its rôle as causative agent is not clear, owing to the simultaneous presence of the influenza B virus.

3. On basis of tests carried out with more than 2000 sera, with pairs among them, collected during the epidemic it could be established that influenza C infections occurred in some areas

of the country during the epidemic, but were considerably less frequent than influenza B infections.

4. The HA spectrum of influenza C virus was determined and it was found that for demonstrating the virus sparrow red cells are more suitable than chicken red cells. By means of slide HA with guinea pig, rat and sheep erythrocytes it was possible to differentiate influenza A-prime, B and C strains from each other.

5. The haemagglutinin of influenza C virus exhibited a heat resistance higher than those of other influenza viruses.

6. The statement of *Hirst* that the cell receptors of the influenza C haemagglutinin differ from those of other influenza viruses, could be confirmed.

Results of the preliminary trials with a method for concentrating and purifying influenza C virus are reported.

LITERATURE

1. *Taylor, R. M.:* Am. J. Publ. Health **39**, 171 (1949).
2. *Francis, Th. Jr., J. J. Quilligan, Elva Minuse:* Science **112**, 495 (1950).
3. *Minuse, Elva and F. M. Davenport:* J. Labor. and Clin. Med. **38**, 747 (1951).
4. *Gerber, P., R. L. Woolridge, J. R. Seal, S. R. Ziegra:* Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. **81**, 624 (1952).
5. *Hirst, G. K.:* J. Exp. Med. **91**, 177 (1950).
6. *Takátsy, Gy.:* Kísérletes Orvostudomány **4**, 60 (1952).
7. *Burnet, F. M., J. F. McCrea and J. D. Stone:* Brit. J. exp. Path. **27**, 228 (1946).
8. *Takátsy, Gy.:* Acta Med. Hung. **3**, 185 (1952).
9. *Takátsy, Gy.:* Acta Microbiol. Hung. **1**. (1954).
10. *Farkas, E., Dömök, I.:* Acta Microbiol. Hung. in press.

ВЫДЕЛЕНИЕ ТИПА „C" ВИРУСА ГРИППА В ВЕНГРИИ

Э. Фаркаш и И. Демек

Резюме

В январе и феврале 1953 года в Венгрии развилась эпидемия гриппа, распространявшаяся по всей стране. В этиологии эпидемии первенствующая роль принадлежала типу В вируса гриппа. Это подтверждается тем, что удалось изолировать большое количество штаммов типа В и большинство больных отвечала нарастанием титра В.

В начале эпидемии из зева одного больного легким гриппоми удалось выделить штамм типа С. По сведениям авторов, в Европе первый раз ими удалось изолировать штамм типа С вируса гриппа. Свойства штамма почти целиком сходны свойствам штамма »1233« Taylor ; человеческое происхождение этого штамма подтверждается значительными специфическими иммунными реакциями. Патогенное действие на человека тоже вероятное, но ввиду того, что он присутствует совместно с типом В, это действие не совсем доказано. На основании опытов с 2000 сывороток, удалось определить, что в стране во многих местах имелись случаи инфекции с типом С, но на много меньше, чем с типом В.

При определении гемагглютинина типа С вируса гриппа, авторы нашли, что красные шарики воробья более подходящие, чем куриные. Гемагглютинация с воробьиными красными кровяными тельцами более чувствительна, ее можно поставить при комнатной температуре и определить результаты даже после длительного стояния. Дифференцировку штаммов А, В, С гриппа авторы проводят путем параллельной агглютинации на предметном стекле красными кровяными шариками морской свинки, крысы и барана.

Тепловая резистентность гемагглютинина вируса С гриппа больше чем у вирусов А и В, рецептор клетки не идентичный с рецептором остальных вирусов гриппа.

Авторы знакомят с предварительными результатами своих опытов по очистке и концентрации вируса С гриппа.

LABORATORY INVESTIGATIONS INTO THE INFLUENZA EPIDEMICS OF 1951 AND 1952 IN HUNGARY

By
I. DÖMÖK, É. SZAFIR and E. FARKAS

State Institute for Public Health, Budapest

Received July 25, 1953

After an interval of a few years' duration due to the war, systematical research work on influenza viruses was resumed in 1948 at the Department of Virus Research of the State Institute for Public Health. Since then, three influenza outbreaks occurred in Hungary, one in February and March, 1949 ; one in February, 1951 ; and one in March and April, 1952. The very mild outbreak of 1949, and the investigations connected with it, have been described in detail [1]. During that outbreak, 3 influenza B strains had been isolated in Budapest and 1 A-prime strain in the country.

In the present paper, investigations carried out in connection with the 1951 and 1952 outbreaks are discussed. A general account of the 1951 epidemic had already been published [2], but the data presented in that communication have been supplemented with new ones.

The 1951 epidemic has been dealt with in detail by *Petrilla* [3]. The epidemic did not extend to the whole country. In Budapest, only sporadic cases and local outbreaks involving small communities, such as some colleges, were observed, while in some areas of the country a mild epidemic occurred, with a high morbidity rate in all age groups, affecting the population of a single or of a number of villages. The number of those absent from schools and factories did not increase in Budapest, but was considerably raised in the epidemic-stricken areas of the country.

The onset of the disease was abrupt. Chills followed by high fever were frequently observed, but cases running a low temperature and not incapacitating the patients were not infrequent either, particularly in Budapest. The duration of the febrile period was often only one day, in the majority of cases 2 to 3 days. The most common symptoms were headache, pain in the limbs and malaise. Coryza and cough were rarely observed, and if they occurred, so mostly at the end of, and after, the febrile period. Loss of appetite was common. Other gastrointestinal complaints were characteristic of some local outbreaks, e. g. in the one from which the strain Hung 10/51 was recovered. Nervous symptoms and complications were most uncommon. A small number of children developed *otitis* and *bronchopneumonia.*

The 1952 epidemic broke out simultaneously in several distant areas of the country between March 15 and 20 and spread rapidly to the whole country, affecting persons of all age groups. The outbreak was explosion-like in some factories and schools. At its peak, the number of those absent from work was strikingly high. In some communities the epidemic had come to an end within 2 to 3 weeks, while it was only at the middle of April that the whole country became free from the epidemic.

The onset was usually abrupt, frequently introduced by chills, and a temperature rising to 39 to 40° C. At the beginning of the illness, catarrhal symptoms were infrequent. Headache, pain in the limbs, depression, loss of appetite, sometimes nausea were characteristic symptoms. The illness usually lasted for 4 to 5 days and, in contrast with the epidemic of the previous year, nearly all patients were confined to bed. Complications were uncommon.

Materials and methods

Strains of virus. Of the strains used for comparison, the PR8, Lee and the strain C 201, were obtained from the Copenhague State Serum Institute ; strains Sweden 3/50 (in the text : Sweden), England 1/51 (in the text : Liverpool, or Lp) and Paris PL 1/49 (Paris) were received from the World Influenza Centre (WIC), while the strain Czech 1949 originated from the Bratislava Central Biological Research Institute. The first three strains have been carried through more than 100 passages, the Paris strain through 17, the other strains through 4 to 10 passages at our Department. The A-prime strain Budapest 4/49 and the B Budapest 1/49 strain were isolated by the amniotic method and carried through 12 and 25 passages, respectively, at this Department. In the experiments, material from the third to fifth passages of the new strains were used.

Isolation experiments. Throat washings obtained by gargling with 15 ml of saline were mixed instantly with broth and stored until used under CO_2 ice. After thawing, penicillin and streptomycin were added and the garglings were inoculated into the amniotic cavity of 8 to 9-day-old, and 11 to 12-day-old chick embryos. Prior to inoculation, the eggs had been kept at 38,0°C, while after inoculation they were incubated at 35,5°C. Amniotic and allantoic fluids were harvested on the third day following inoculation if the embryos were of weak movement, while from actively moving ones the fluids were withdrawn on the fourth. The first three passages were carried out mostly by inoculating amniotic fluid diluted at a ratio of 1 to 100.

Immune sera. Six to eight-week-old chicken were inoculated intravenously, with 1 ml of allantoic fluid of an agglutination titre of at least 1 to 100. Inoculation was repeated after five days, and after another five days the chicken were killed by bleeding. Syrian hamsters were inoculated at weekly intervals. A total of 3 intraperitoneal inoculations each time with 1,5 ml of allantoic fluid, were given. The animals were sacrificed by bleeding one week after the last inoculation. The sera were inactivated at 56°C for 30 minutes and stored in frozen state until used.

Red cells. Blood obtained from the wing vein of chicken or from the heart of guinea pigs, was immediately mixed with $^1/_5$ volumes of 3,8 per cent sodium citrate ; the red cells were washed with saline four times and were stored at 4°C for periods not longer than 4 days.

Haemagglutination (HA) tests. The loop dilution method of *Takátsy* [4] was used. By means of a calibrated instillator, 0,025 ml drops of the 1 per cent red cell suspension were placed into the grooves of plexiglass plates. Viral dilutions were prepared on the plate with the aid of a 0,025 ml loop. The plates were then placed in a refrigerator. Reading for chicken cells were made after 20 minutes, those for guinea pig cells after 40 to 45 minutes, by the sedimentation pattern method. Before haemagglutination-inhibition tests, the 4 HA units were estimated using similar volumes and a similar length of time as in the main experiment.

Haemagglutination inhibition (HI) tests. The loop method of *Takátsy* [4] was employed. To serum dilutions of 0,025 ml volume an equal volume of virus containing 4 HA units was added. The mixture was allowed to stand for 10 minutes at room temperature and then 0,025 ml of a 1 per cent chicken red cell suspension was added. Saline was used as diluent.

Complement fixation and neutralization tests were carried out according to a method described in another communication [5].

Index numbers (»d« values) characterizing strain differences. The identity of, or difference between, individual strains were determined as usual in cross HI tests but a new type of index number has been used. These index numbers, being natural whole numbers, are easier to interpret and reckon with than the fractions favoured by the WIC. The calculations involved in computed »d« values are given in Table I.

Table I

Calculation of »d« values

Serum	Virus	Degree of HA inhibition at serum dilution 1 to								
		25	50	100	200	400	800	1600	3200	S
Anti-X	X	4	4	4	4	4	4	2	—	26
Anti-Y	Y	4	4	4	4	—	—	—	—	+16
		Homologous inhibition, total								42
Anti-X	X	4	4	4	3	—	—	—	—	15
Anti-Y	Y	4	4	4	4	1	—	—	—	+17
		Heterologous inhibition, total								32

»d« (difference between homologous and heterologous inhibition) = 42 — 32 = 10

4 = total inbition ; 3, 2, 1 = partial inhibition. — = complete HA.
S = sum of the values in one line.

In each titration line the numbers showing the degree of inhibition are added. The two values for homologous titration and the two for heterologous titration are added separately and the sum of the latter addition is deducted from that of the former. The result obtained is the »d« value. If two strains are identical, theoretically »d« = 0 and the less close the relation between two strains, the higher the »d« value.

The WIC employs the following calculation. The homologous and heterologous titres for each of two sera are estimated. The fractions representing the homologous titre of the two sera are divided by the fractions representing the heterologous titres and the geometrical mean of the two ratios so obtained is given as a fraction, in which the numerator is always 1.

If two strains are identical, the denominator is also 1, this corresponds to d = 0. If the fraction is $\frac{1}{2}$, then d = 8 ; $\frac{1}{4}$ corresponds to a d of 16, $\frac{1}{8}$ to a d of 24. The denominator (D) of the fraction can be calculated from the »d« value by the formula,

$$D = \text{antilog } 0{,}0376\ d.$$

In general, the »d« values were calculated from two parellel estimations for each 3 individual sera (a total of 18). Statistical analysis revealed that in such calculations values of or above 5 represent a significant difference between the antigenic structure of the two strains.

Designation of strains

The strains were designated with Arabic numerals in order of isolation, and with the last two figures of the year of isolation. Strains isolated in Budapest bear the abbreviation Bp, those isolated in the country, Hung (for Hungary) before the figures.

Experimental

Strains isolated in 1951. In the winter of 1950-51, throat washings from 55 patients living in Budapest and from 29 patients from the country were studied. From the former 10 strains (Bp 1—9/51 and 12/51) and from the latter 2 strains (Hung 10/51 and 11/51) were isolated. The first and the last successful isolation was made from garglings obtained on January 30 and March 1, respectively. Every strain could be demonstrated as early as in the first passage by the guinea pig red cell agglutination method. In the first passage every strain was in the O phase. Modification to D phase was observed in the second passage of strain Hung 10/51, and in the third passage of the other strains.

Preliminary typing revealed that strain Hung 11/51 was of the B type, while other strains belonged to the A-prime type.

At first eight of the newly isolated Bp strains and the strain Hung 10/51 were compared with one another by means of cross HI test using chicken sera. The 28 »d« values indicating the differences between the Bp strains gave a mean of 0,02, while the mean of the 8 »d« values showing the difference between the 8 Bp and the only country strain was 10. Thus, chicken sera failed to distinguish the Bp strains, while in the latter case the difference was significant.

Subsequently, the new strains were compared with known A-prime and A strains, using chicken sera. Apart from permissible variations, the Bp strains were similar again and therefore the »d« values for Bp strains are not shown one by one in Table II (above the diagonal line), only the mean of the 8 »d« values is given. Data indicating the relationship between strain Hung 10/51 and the older strains, as well as that between individual older strains are given one by one.

The 8 Budapest strains did not differ either from each other, or from the »Sweden« (Scandinavian subtype) or the Liverpool strains. It was only against the two 1949 A-prime strains that any appreciable difference presented itself. Strain Hung 10/51 differed not only from the Bp strains, but also from each of the A-prime strains tested, in an approximately similar degree.

By means of determinations employing chicken sera we were unable to differentiate between the Scandinavian and Liverpool strains representing the two European subtypes of 1951 [6]. In contrast with this, the Paris and Bp 4/49 strains differed significantly from each other, although *Chu et al.* [7] have

Table II

Comparison of influenza A-prime strains isolated in 1951, with each other and with older strains
Below the diagonal line: »d« values obtained with hamster sera
Above the diagonal line: »d« values obtained with chicken sera

Strains	Bp 7/51	Hung 10/51	Liverpool	Sweden 3/50	Paris	Bp 4/49	PR8
8 Budapest strains		10	3	0	6	17	> 42
Hung 10/51	24		11	14	10	16	> 42
Liverpool	24	3		0	3	22	> 52
Sweden 3/50	8	15	19		7	24	> 31
Paris	14	12	15	8		22	> 48
Bp 4/49	23	13	15	23	9		—
PR8	> 48	> 48	> 48	> 48	> 48	> 48	

The Arithmetical mean of the 28 »d« values indicating the difference between the 8 Budapest strains : 0,02.

found them identical by means of determinations employing ferret sera. It should be noted, however, that strain Bp 4/49 has been carried through numerous passages since then. Each of the A-prime strains differed sharply from strain PR8 and from one of the Hungarian classical A strains (C 201, not shown in the Table).

In a paper published in 1951 [2] we have suggested that the cause why our results did not agree with those of *Isaacs* and *Andrews* [6] was that we had used chicken serum. Since then, two communications [8, 9] confirmed this belief. In order completely to elucidate this problem, strains Bp 7/51, Hung 10/51, as well as the Lp and Sweden strains were tested against hamster sera in 1952. The results are shown in Table II, below the diagonal line. According to the results, strain Bp 7/51 is in the closest relationship with the Sweden strain, while the Liverpool strain stands nearest to Hung 10/51. The two foreign and the two Hungarian strains differ very sharply from each other. On this basis the Budapest strains may be closest to the Scandinavian, and the country strain to the Liverpool subtype.

Thus, we were able to justify our view and confirm the data of others concerning this problem. On the other hand, it is interesting that with the aid of the less specific chicken serum we could sharply differentiate between strains Lp and Hung 10/51, apparently identical in tests employing hamster sera. In order to confirm this, in 1953 two new chicken sera were prepared against each of two Hungarian and two foreign respresentative strains ; with this material we have succeeded in reproducing with satisfactory accuracy the results obtained in 1951.

The only influenza B strain isolated in 1951 was compared with stock influenza B strains. The »d« values obtained with chicken sera are shown in Table III.

Table III

»d« values expressing the difference between individual influenza B strains

	Czech 1949	Bp 1/49	LEE
Bp 11/51	4	9	> 20
Czech 1949	—	5	> 30
Bp 1/49	—	—	17

Thus, the influenza B Hung 11/51 strain is distantly related to the Lee strain and is in the closest relationship with the Czech strain isolated in 1949. It is somewhat less closely related to strain Bp 1/49. These determinations have not been reproduced with hamster sera.

Strains isolated during 1952. During March and April 1952, we attempted the isolation of virus from 5 throat washings originating from Budapest and from 13 obtained in the country. One strain was isolated from the Budapest material and five from country samples. Four strains were recovered from material originating from a village in the eastern district of the country and one (Hung 5/52) was from the western border of Hungary. All the 5 country strains were isolated from throat washings obtained on March 21, while the Bp 6/52 strain was recovered from a throat washing taken five days later. With one exception the strains were isolated from throat washings obtained during the first 3 days of the disease. Eight-day old embryos were found to be more suitable for isolation than eleven-day old ones.

Each strain belonged to the A-prime subtype. In the first passage every strain was in the O phase. Conversion to D phase occurred in the second passage in the case of strains Hung 2/52 and 3/52, and in the third passage of the other strains.

One strain (Hung 4/52) was lost after the third passage, thus, the number of comparable strains was reduced to 5. Comparison was carried out by the hamster serum method. The results are shown in Table IV.

Three of the strains appeared to be identical, while strain Hung 3/52, and even more so, strain 2/52 markedly differed from the other strains.

The 1952 strains were compared with strains of the previous year, as well as with foreign and Hungarian A-prime and A strains. The results are tabulated in Table V.

The results show that strains Hung 1/52 and 5/52 are more closely related to the Liverpool than to the Scandinavian subtype. This difference does not

Table IV

Comparison of strains isolated in 1952 with one another (»d« values)

	Hung. 1/52	Hung. 5/52	Bp. 6/52	Hung. 3/52
5/52	2	—	—	—
6/52	2	0	—	—
3/52	14	11	14	—
2/52	16	21	16	11

Table V

Comparison of strains isolated in 1952 with older strains (»d« values)

	Sweden	Bp. 7/51	Lp.	Hung. 10/51	Paris	Bp. 4/49	PR8	201
1/52	10	14	9	9	9	19	>41	>42
5/52	12	14	4	5	8	15	>46	>43
6/52	8	8	8	7	7	15	>39	>39
3/52	10	18	25	26	20	>31	>38	>38
2/52	20	20	34	37	30	27	>40	>38

present itself in the case of strain 6/52. Strain Hung 3/52, but particularly strain 2/52, are distantly related to the Liverpool subtype, but their relationship to the Scandinavian subtype is even more distant than that of the other three strains. To the Paris and to the Lp strains the new ones show similar relations. Strain Bp 4/49 differs rather markedly from each of the strains, although it resembles more closely the 3 uniform strains than the two divergent ones.

P and Q phases. By means of the cross-haemagglutination-inhibition tests described it could be proved that the Lp strain was in the P phase and the Sweden 3/50 strain in the Q phase. It was also found that strain Bp 7/51 classified into the Scandinavian subtype was equally in the Q phase, while strain Hung. 10/51 was not so markedly in the P phase as was the Lp strain.

The 1952 strains were unusual in this respect, too. Strain Hung 5/52 was definitely in the P phase, strains Hung 1/52, Hung 2/52 and Bp 6/52 were markedly less so, while strain Hung 3/52 was found to be in the Q phase.

In agreement with *Isaacs* et al. [8] we have found the two 1949 strains to be rather Q phase than P phase.

Serological investigations. During and immediately after, the epidemic of 1951, 591 sera and pairs of sera were tested against influenza A and B antigens by the complement fixation method. Similar tests during the 1952 epidemic involved 316 sera, with pairs of sera among them. No detailed account of the results will be given, only the conclusions drawn will be discussed.

Only a small proportion of the Hungarian population contracted infection with influenza in 1951. Both in Budapest and in the country influenza A infection appeared to be the more frequent, but during the outbreak rises of B titres were also detected in three villages distant from each other. In Budapest, it was only in one college that we found an epidemic that on the basis of serological responses was considered to be due to influenza B. In 11 of the cases examined a double infection had to be assumed.

In 1952 rises in titre occurred only with influenza A and in none of the cases were we able to detect an influenza B titre exceeding 1 to 32. Consequently, the conclusion was drawn that in that outbreak the influenza B. virus played no part at all. In accordance with the epidemiological data, serological evidence also indicated that in 1952 a much higher proportion of the Hungarian population was infected with influenza than in 1951.

By means of HI tests much more specific than complement fixation attempts were made to decide which of the serologically different strains was more widespread. No definite evidence was obtained and it could only be inferred that in 1951 the Liverpool subtype predominated in the country, while the Scandinavian subtype was more common in Budapest as suggested also by evidence obtained in strain isolation experiments.

Discussion

As regards the Hungarian epidemics, the following facts have to be emphasized.

a) In 1951, there was a difference between the Budapest and country outbreaks.

b) In two consecutive years influenza epidemics due to the same type of virus were observed which is an unusual occurrence.

c) In 1952, the epidemic broke out in an unusual season.

As regards laboratory findings the following were of importance.

a) In 1952, it was just the strain isolated in the country that differred from the Budapest strains which, in their turn, closely resembled each other.

b) In neither years were the A-prime strains uniform.

c) In 1952, on the same day, in the same village, and in the same factory, 3 different strains were isolated from patients. One of the strains was identical with strains isolated in two remote areas of the country at the same time.

It was tried to establish a correlation between epidemiological and laboratory evidence.

The fact that the Budapest outbreak yielding strains belonging to the Scandinavian subtype was much milder than some of the outbreaks in the country, may be brought into relation with strain difference, the more so, since in

Liverpool the epidemic caused by the subtype named after that town was more serious, than was in other parts of Western Europe the outbreak due to strains of the Scandinavian subtype. The serological evidence obtained was, however, not definite enough to permit to exclude the assumption that differences in the immunbiological state of the population were responsible for the differences in the epidemic's severity in various parts of the country.

The occurrence of influenza epidemics in two consecutive years may be attributed to the fact that in 1951 the epidemic did not spread to the whole country and that the antigenically different strains induced low cross immunity. In addition, in March and at the beginning of April, unusually cold weather was experienced in Hungary. This may have been one of the factors responsible for the activation of the epidemic in an unusual season, 14 months after the previous epidemic.

Another epidemiological observation of some interest is that to our knowledge during 1952 in Western Europe no influenza epidemics occurred in which influenza A-prime strains would have played any significant role. Such epidemics were not reported but from the Soviet Union [12].

It was striking that in 1952, in the same village a variety of strains should occur. This was perhaps because, due to the variations of the 1951 epidemic, and to the resulting heterogeneous immunity, the virus responded by appropriate changes to the different reaction of the individuals. In this connection, reference is made to the work of *Zhdanov. et al* [12] in which the role of the human organism as the immediate environment bringing about modifications in the virus is emphasized. Experimental data presented by *Archetti and Horsfall* [13] support this view.

In addition to differences in antigenic structure, the shifting of P and Q phases is also worth mentioning.

Van der Veen and Mulder [10] were the first to mention strains of virus differing only in the one quality that haemagglutination of one of the strains was inhibited at a higher titre of the same homologous immune serum than haemagglutination of the other strains. The terms P phase and Q phase have been introduced to denote the state of the former and latter strains, respectively. *Isaacs et al.* [8] confirmed the observations of the Dutch authors and demonstrated that P strains can be converted into the Q phase by means of cultivation in the presence of a homologous immune serum, while, by means of repeated passages in mice, the strains are readily reconvertible into P phase. The authors mentioned are of the opinion that *the* Q *phase strain became adapted to its homologous immune serum* and attributed an epidemiological significance to the finding, on the basis of the following evidence.

a) A-prime strains first appearing in 1947 were definitely P phase.

b) In 1949 intermediary strains shifting toward the Q phase have already appeared.

c) During the summer of 1950, definitely Q phase strains were isolated in Sweden (e. g. Sweden 3/50).

d) Late in the autumn of 1950, an epidemic spread from Swedish focus, from which strains belonging to the Scandinavian subtype, but not definitely Q phase, were recovered.

e) In contrast to this, strains belonging to the Liverpool subtype carried into England from outside Europe were definitely in the P phase.

The explanation given by the above authors to interpret their observations, is as follows.

a) In 1947, no immunity to the A-prime subtype was present in the European population, consequently the strains did not need to adapt themselves.

b) The 1949 strains already began to adapt themselves to the immune environment.

c) The 1949 virus, adapting itself to the immune population of Sweden, could prevail in that country, causing mostly sporadic cases, until, in 1950,

d) the immunity of the population had become sufficiently reduced to allow an epidemic to break out. In the course of the epidemic the adaptation of the strain decreased.

e) The Liverpool subtype did probably not live in an immune environment for a prolonged period and was, therefore, not forced to convert into the Q phase. As early as in 1952, however, Q strains belonging to the Liverpool subtype were also isolated [11].

Thus, according to the above authors, influenza strains would be able to prevail during inter-epidemic periods by adapting themselves to the immune environment, i. e. by conversion into the Q phase. After reaching a non-immune community, the strain in the Q phase may give rise to an outbreak and revert to the P phase.

As to their phase, our 1951 strains did not completely agree with those observed in other countries, since our Lp subtype was more in an intermediate than in the P phase. The 1952 strains were irregular also in this respect, probably in consequence of the immunobiological heterogenity of the population.

Almost every finding was illustrative of the unusually wide variations and variability of the influenza virus.

No influenza strains of the classical A type were isolated in our tests. This negative evidence supports the view suggested by *Zhdanov* et al. [12] and by workers of the WIC, that the classical A type disappeared completely during recent years and its place was occupied by the A-prime subtype.

The local occurrence of the B type mainly in the country, may be one of the factors responsible for the variability of the 1951 epidemic.

On basis of the observation that by means of testing with chicken serum it was possible to demonstrate strain differences not revealed by tests made with the allegedly highly specific hamster sera, it appears reasonable to

suggest that the procedures aimed at elucidating finer strain structures should be supplemented with tests employing chicken sera.

SUMMARY

A very mild influenza epidemic occurred in Hungary in 1951. In Budapest, mainly sporadic cases showing mild clinical symptoms were observed, there having been no real epidemic. From certain areas of the country outbreaks not much less mild in clinical course but with a high morbidity rate, were reported. In 1952, a rapid influenza outbreak with a high morbidity rate spread all over the country.

By virus isolation and serological tests it was confirmed that in 1951 viruses of the A-prime type were predominantly responsible for the outbreaks although cases due to influenza B also occurred. From the Budapest cases strains belonging to the Scandinavian subtype were isolated, while in the country only two strains were isolated, one of which was of the B type and the other, belonging to the Liverpool subtype.

All the strains isolated from the 1952 epidemic belonged to the A-prime type. Of these, 3 could be classified into the Liverpool subtype, while two were sharply different and did not resemble the Scandinavian subtype, either. From throat washings obtained in the same village on the same day, 3 different virus strains could be isolated.

Chicken immune sera fail to distinguish between Scandinavian and Liverpool subtypes, although they reveal differences not demonstrable with hamster sera.

The Hungarian strains of the Liverpool subtype were in the P phase, even if not as markedly so, as the prototype of this subtype. Strains closer to the Scandinavian subtype were in the Q phase, similarly to the prototypes. Two strains isolated in 1952 did not resemble either subtype. One of them was in the P, another in the Q phase.

LITERATURE

1. *Farkas E., Takátsy Gy.:* Népegészségügy **30.** 402. (1949).
2. *Dömök I., Farkas E., Gál, M.:* Népegészségügy **32.** 449. (1951).
3. *Petrilla A.:* Népegészségügy **32.** 444. 1951.
4/a *Takátsy Gy.:* Kísérletes Orvostudomány **4.** 60. (1952).
4/b *Takátsy Gy.: Fürész J., Farkas E.:* Acta Physiol. Hung. (1954).
5. *Farkas E., Dömök, I.:* Acta Microbiol. Hung. **1.** (1953).
6. *Isaacs A., Andrewes C. H.:* Brit. Med. J. **2.** 921. (1951).
7. *Chu C. M., Andrewes, C. H., Gledhill, A. W.:* Bull. Org. Mond. Santé **3.** 187. (1950)
8. *Isaacs A., Gledhill A. W., Andrewes, C. H.:* Bull. WHO. **6.** 287. (1952).
9. *Hilleman M. R., Horsfall, F. L. Jr.:* J. Immunol. **69.** 343. (1952).
10. *Van der Veen J., Mulder, J.:* Onderzoekingen en Mededelingen uit het Instituut voor. Preventieve Geneeskunde No 6. (1950). Stenfort Kroese, Leiden.
11. *Isaacs A.:* Lancet, 1 : 676, (1953).
12. *Жданов, В. М.:* Журнал Микробиол., Эпид. и Иммунобиол. (1953.)
13. *Archetti I., Horsfall F. L. Jr.:* J. exp. Med. **92.** 441 (1952).

ЛАБОРАТОРНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЭПИДЕМИИ ГРИППА 1951 И 1952 ГГ. В ВЕНГРИИ

И. Дэмэк, Э. Сафир и Э. Фаркаш

Резюме

В 1951 году в Венгрии эпидемия гриппа проходила в очень умеренной степени. В Будапеште оказывались спорадические заболевания сопровождаемые очень умеренными клиническими симптомами, так что эти случаи нельзя считать выразительной эпидемией. В некоторых районах Венгрии замечалась эпидемия гриппа с высокой заболеваемостью, но сопровождаемая не менее умеренными клиническими симптомами. В 1952 году распространялась эпидемия гриппа по всей стране, но она продолжалась очень недолго. Эта эпидемия сопровождалась высокой заболеваемостью.

Применяя способ изолирования вируса и серологические исследования авторам удалось доказать, что в этиологии эпидемии 1951 года главную роль играл подтип A_1 вируса эпидемического гриппа, а так же и тип Б. Из выделений больных, проживающих в Будапеште, удалось вырастить штаммы, принадлежащие к скандинавской подгруппе вируса, а в провинции один штамм типа Б и штамм подтипа A_1, принадлежащий к ливерпульской подгруппе.

Во время эпидемии в 1952 году культивировались только штаммы A_1; три из них можно отнести к ливерпульской подгруппе, а два штамма остро отличаются от ливерпульской и скандинавской подгруппы. Эти два штамма отличаются и друг от друга. В одной местности изолировали 3 различных штамма из жидкости для полоскания горла (исследование у всех больных проведено в тот же день).

Иммунная сыворотка эмбриона цыпленка не пригодна для различения скандинавского подтипа от ливерпульского, однако пользуясь сывороткой из эмбриона цыпленка удалось обнаружить разницу между вышеприведенными штаммами, которую невозможно было установить в ходе исследований, при которых пользовались сывороткой хомяка.

Венгерские штаммы, которые можно отнести к ливерпульской подгруппе, находились в фазисе P, хотя и не в такой степени как прототипы этой подгруппы. Штаммы, которые можно отнести к скандинавской подгруппе, находились в фазисе Q. Один из штаммов, не принадлежащий ни к одной из этих групп находился в фазисе Q, а другой в переходном фазисе.

Приведенные результаты наших исследований являются новым доказательством чрезвычайного разнообразия и изменчивости вируса эпидемического гриппа, в чем организм человека играет важную роль, являясь непосредственной средой вируса.

ISOLATION OF INFLUENZA VIRUS STRAINS IN CONNECTION WITH THE EPIDEMIC IN SZEGED DURING THE YEAR 1952

By

E. SZÖLLŐSY, A. ÁBRAHÁM and L. ALFÖLDI

Institute for Microbiology of the Medical University, Szeged

Received July 21, 1953

During March and April, 1952, an influenza epidemic occurred in Hungary extending to the whole country. In connection with the investigations of *Dömök* and associates [1] we have also attempted to isolate and identificate the virus from cases in Szeged and its environs.

Methods

Isolation of the virus. Throat washings were obtained from patients by gargling with 15 ml of saline after a forced cough. Some ml of broth were then added to the washings and the mixture was immediately centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes. Two thousand units of penicillin and 1 mg of streptomycin were added to each ml of the decanted supernatant and after standing for 15 minutes the mixture was inoculated into the amniotic cavity of 5 eggs per sample. At first the isolation was attempted in 12 to 13 day-old embryonated eggs. As this method did not prove satisfactory, later on eggs 9 to 12 days old were used. After inoculation, the eggs were incubated at 36°C for 5 days.

Haemagglutination test. Twofold dilutions in 0,1 ml volume of the virus material to be tested were made with *Takátsy*'s loop [2] on a grooved glass plate. To each dilution 0,1 ml of 0,5 per cent washed guinea pig, or chicken erythrocyte suspension was added. Agglutination was recorded after 25 minutes, standing at room temperature. The highest dilution causing partial haemagglutination was taken as the end-point.

Preparation of immune sera. Immune sera for type identification were prepared as follows. Chicken 6 weeks of age were given in 5 day intervals 3 times 1 ml of the 5th allantoic passage material. On the 5th day after the last inoculation, blood samples were taken by heart puncture and the sera stored in a refrigerator until used.

Haemagglutination inhibition test. Twofold dilutions of immune sera were made in 0,1 ml volume ; to this, 0,05 ml of such a virus-preparation was added that the final 0,25 ml volume of the whole system should contain 4 haemagglutinating units. The mixture was allowed to stand at room temperature for 30 minutes and then 0,1 ml of 0,5 per cent washed chicken erythrocyte suspension was added to each dilution. Haemagglutination inhibition was recorded after an additional incubation of 25 minutes.

Results

Virus isolation was attempted during the prodromal period of the illness from 25 typical cases of influenza occurring in Szeged and its environs. In 11 cases the amniotic fluid from the first egg passage readily agglutinated guinea pig erythrocytes at a dilution of 1:8 to 1:16, but it was incapable of agglutinating chicken erythrocytes. In further amniotic passages we finally succeeded in isolating four strains. After the 3rd chicken embryo passage all the 4 strains

were detectable either by guinea pig or by chicken erythrocyte agglutination in both the amniotic and allantoic fluids. At this time the haemagglutination titre reached 1 : 64 to 1 : 128, and the strains turned from the original »O« into the »D« phase.

By means of a haemagglutination inhibition test we compared our strains with each other and with the influenza strains A (PR 8) ; B (Lee) ; influenza A' (Paris PL 1/49, England 1/51, Sweden 3/50, Budapest 7/51 and Hungary 10/51). Data concerning these strains have been discussed in detail by *Dömök* and associates [1]. Three parallel estimations were made of all haemagglutination inhibition tests and the tables present mean values of three parallel experiments. The relation between the different strains is expressed in »d« values introduced by *Dömök* and associates [1]. With two identical viruses the value of »d« is 0, whereas the greater the difference between two strains, the greater the »d« value. Differences smaller than 5 have not been taken in account.

Table I

Relation of the isolated influenza strains to each other as revealed by the haemagglutination inhibition test

Strains isolated	Szeged 1/52	Szeged 2/52	Szeged 3/52	Szeged 4/52
Szeged 1/52	0*	2	12	11
Szeged 2/52	2	0	10	11
Szeged 3/52	12	10	0	5
Szeged 4/52	11	11	5	0

*»d« values.

Table I shows the relations between the four strains isolated in Szeged. Using the above method, two strains, Szeged 1/52 and Szeged 2/52, proved identical, as well as the strains Szeged 3/52 and Szeged 4/52, in spite of the slight difference observed. The two latter strains differed quite markedly from both Szeged 1/52 and 2/52. Strains Szeged 1/52 and Szeged 2/52 were isolated from patients living in the environs of the town, while strains Szeged 3/52 and 4/52 originated from Szeged itself.

In Table II we present comparative data obtained with the strains isolated in Szeged and those listed above.

One can establish on the basis of the »d« values obtained, that the strains from Szeged do not belong to the type B influenza viruses, and are far from being related to the classical PR 8 strain of the A type.

In contrast to these findings, the »d« values obtained with the strains England 1/51, Paris, Sweden 3/50, Budapest 7/51 and Hungary 10/51 are markedly lower, consequently the viruses isolated by us belong to the A-prime type.

Table II

Relation of the isolated influenza virus strains to different known strains as revealed by the haemagglutination inhibition test

New strains	Strains tested						
	PR 8	Lee.	England 1/51	Paris	Sweden 3/50	Budapest 7/51	Hung. 10/51
Szeged 1/52	41*	47	10	15	5	2	18
Szeged 2/52	40	48	8	13	2	4	13
Szeged 3/52	36	38	11	16	5	5	12
Szeged 4/52	42	50	22	22	8	12	25

*»d« values.

Within this subtype they show the greatest similarity with the strains Sweden 3/50 and Budapest 7/51, and are closely related to the Liverpool strain.

On the other hand, the »d« values of above 10 obtained when comparing the strains Paris and Hungary 10/51 refer to a definite difference between these strains.

The strains Szeged 4/52 and Szeged 3/52, when compared with the other two strains from Szeged by means of the haemagglutination inhibition test, exhibited a closely similar behaviour. See Table I. The comparative data presented in Table II show, that strain Szeged 4/52 is more different from the strains tested, than strain Szeged 3/52.

The relation of our strains to each other and to different strains tested, as expressed in the form proposed by the World Influenza Centre, is presented in Table III. As to the method of calculation we refer to the study of *Dömök* and

Table III

Data of Tables I. and II. expressed in international values

New strains	Strains compared							New strains			
	PR 8	Lee	England 1/51	Paris	Sweden 3/50	Bpest 7/51	Hung. 10/51	Szeged 1/52	Szeged 2/52	Szeged 3/52	Szeged 4/52
Szeged 1/52	1/34,9	1/58,0	1/2,4	1/3,7	1/1,5	1/1,2	1/4,8	1/1	1/1,9	1/2,8	1/2,6
Szeged 2/52	1/32,0	1/64,0	1/2,00	1/3,1	1/1,2	1/1,4	1/3,1	1/1,2	1/1	1/2,4	1/2,6
Szeged 3/52	1/22,6	1/26,9	1/2,6	1/4,0	1/1,5	1/1,5	1/2,8	1/2,8	1/2,4	1/1	1/1,5
Szeged 4/52	1/38,0	1/75,0	1/6,72	1/6,7	1/2,0	1/2,8	1/8,7	1/2,6	1/2,6	1/1,5	1/1

associates [1]. With this method the difference between two strains is symbolized by a fraction. In the case of identical strains the numerical value of the fraction is 1/1. The greater the difference between two strains the greater the numerical value of the denominator.

It must be mentioned that for the exact antigen analysis of influenza viruses ferret serum is more suitable than chicken serum. Strains showing the same serological character with chicken serum may prove different if ferret serum is used. Therefore our experiments give only informative data about the serological relations of the strains isolated.

SUMMARY

(1) During the 1952 influenza epidemic in Hungary we succeeded in isolating four strains. Out of these two (Szeged 3/52, 4/52) originated from Szeged, while the other two (Szeged 1/52, 2/52) were isolated from patients living in the environment of the town.

(2) Serologically the strains from Szeged proved to be identical. Those from the environs, while closely related to each other, differed markedly from both of the other strains.

(3) All the four strains isolated belong to the subtype A-prime and are closely related to the strains Sweden 3/50 and Budapest 7/51.

Acknowledgement. We are greatly indebted to Julia Kovács M. D., for the throat washings of her selected patients.

LITERATURE

1. *Dömök I., Szafir É.* and *Farkas E.:* Acta Microbiologica **1** (1953) in press.
2. *Takátsy Gy.:* Kísérletes Orvostudomány **2**. 390 (1950).

ВЫДЕЛЕНИЕ ШТАММОВ ГРИППА ВО ВРЕМЯ ЭПИДЕМИИ В Г. СЕГЕД В 1952 Г.

Э. Сэллэши, А. Абрахам и Л. Альфэльди

Резюме

В марте и апреле 1952 года во всей стране в большом количестве встречались заболевания гриппом. Мы также, как и в Будапеште, в Государственном Институте Здравоохранения занимались выделением и определением вируса гриппа, для того, чтобы собрать данные о типах вируса гриппа встречающихся в нашей стране и по поводу эпидемиологии этого заболевания.

Выделение вируса происходило путем посева в оплодотворенном курином яйце. Определение вирусов происходило методом торможения гемагглютинации с применением иммунной сыворотки курицы.

Во время нашей работы нам удалось изолировать 4 штамма гриппа, двух из случаев в г. Сегеде и двух в окрестностях г. Сегеда. Изолированные в г. Сегед штаммы »Сегед 1/52« и »Сегед 2/52« оказались близкими друг к другу.

Четыре изолированных штаммов относятся к подгруппе »A'« вируса. Внутри этой подгруппы имеется большое сходство со штаммами »Шведское 3/50« и »Будапешт 7/51«.

UNTERSUCHUNGEN DES B_{12} VITAMINGEHALTES VON LEBEREXTRAKTEN MIT ANWENDUNG ELEKTROPHORETISCHER UND MIKROBIOLOGISCHER METHODEN

Von

ÉVA CSEREY-PECHÁNY und B. MOLNÁR

Biochemisches Laboratorium der Chem. Fabrik Gedeon Richter

Eingegangen am 29. Juli 1953

Zahllose Literaturdaten berichten darüber, dass bei der mikrobiologischen Wertbestimmung der Leberextrakte die verschiedenen Bakterienstämme völlig abweichende Resultate geben. Dieser Fall besteht auch dann, wenn die Anwendung der Stämme mit der gleichen Untersuchungsmethode erfolgt, finden sich ja zwischen den mit der Plattenmethode durchgeführten vergleichenden Messungen der Bakterienstämme L. leichmannii, L. dorneri und E. coli Differenzen wechselnder Grösse, welche die Fehlergrenze weit überschreiten. Zweck unserer gegenwärtigen Untersuchungen war die Eruierung der Ursache dieser Messungsdifferenzen und die Ausarbeitung einer solchen Methode, wodurch die Faktoren, welche die Unsicherheit der Bestimmung verursachen, ausgeschaltet werden können. Die Mehrzahl der Autoren erblickt die Ursache der vom Bakteriumstamm abhängigen, abweichenden Resultate in aspezifischen, wachstumshemmenden, oder fördernden Fremdstoffen, denen gegenüber die einzelnen Bakterienstämme in verschiedenem Masse empfindlich sind. Man versuchte die durch die aspezifischen Stoffe verursachten Messungsfehler auf verschiedene Weise auszuschalten. Die grösste Verbreitung fand die mit Zwischenschaltung der alkalischen Hydrolyse ausgeführte doppelte Wertmessung [1]. Bekannt sind die sogenannte kompensierende Methodik [2], sowie jene Methoden, die mit Hilfe von Lösungsmitteln, iontauschendem Harz [1], Papier- oder Säulenchromatographie [1, 3, 4, 5], ferner Papierelektrophorese [6, 7] die störenden Stoffe vor der Messung aus dem Untersuchungsobjekt entfernen.

Wir versuchten den supponierten aspezifischen Wachstumsfaktor nach der von C. H. *Schwietzer* [6] angegebenen Methodik mittels Papierelektrophorese auszuschalten. Wird bei Anwendung der genannten Methode, nach Elektrophorese der Leberextrakte der Papierstreifen in Ultraviolettlicht untersucht, so treten den Fremdstoffen entsprechend fluoreszierende Linien in Erscheinung. Da es in Vorversuchen festgestellt wurde, dass — bei der unter gleichen Bedingungen ausgeführten Elektrophorese — das den Extrakten in grosser Menge zugesetzte, mit freiem Auge verfolgbare B_{12} stets an die gleiche Stelle der durch die Begleitstoffe erzeugte fluoreszierende Zone wandert, hielt man bei der effektiven Messung den von dieser Stelle des Papierstreifens ausge-

lösten wachstumsfördernden Stoff für B_{12}, den von den übrigen Stellen des Streifen ausgelösten Wirkstoff aber für einen aspezifischen Verunreinigungsstoff. Die von uns untersuchten reinen Leberextrakte ergaben jedoch keine scharf abgegrenzten, fluoreszierenden Zonen, deshalb teilten wir nach Orientierung mittels der Bioautograph-Methode den mit dem gleichen Stoff parallelen Papierstreifen in seiner ganzen in Betracht kommenden Länge in Schnitte auf, und nach separater Lösung der einzelnen Streifen führten wir deren mikrobiologische Wertbestimmung durch.

Methodik

Wir führten die Elektrophorese in dem von *Grassmann* und *Hannig* angegebenen Apparat [8] nach der von C. H. *Schwietzer* mitgeteilten Technik aus. Es wurden aus Filtrierpapier *Schleicher-Schüll* Nr. 2043 28 cm lange, 3 cm breite Streifen ausgeschnitten, die in der Feuchtkammer horizontal ausgespannt, mit ihren beiden Enden in eine Pufferlösung von n/20 Natriumborat und n/15 prim Kaliumphosphat (pH 8,6) getaucht wurden. Die Streifen wurden nach Befeuchtung mit der Pufferlösung in die elektrophoretische Zelle gebracht. Nach Ablauf einer halben Stunde wurde der Papierstreifen an der + Seite, 35 mm vom Rande der Küvette entfernt, sanft abgetrocknet und von der Mikropipette 0,01 ml. des Untersuchungsstoffes linear aufgetragen. In einigen Versuchen trugen wir den Untersuchungsstoff auf die Mitte des Papierstreifens. Die Einrichtung wurde mit einem Lichtschutzschirm abgedeckt und auf die Zelle 145 V Spannung geschaltet. Die Spannung wurde stündlich auf 175—205—255 und schliesslich auf 310 V erhöht. Nach 5 Stunden wurden die Streifen herausgenommen und rasch getrocknet. In einzelnen Fällen setzten wir ausser den Untersuchungsstoffen auch einen mit $1^0/_{00}$ B_{12} Lösung belegten Streifen auf. Auf Grund der Wanderung des sichtbaren farbigen Streifens konnten wir auf die Stelle des B_{12} an den übrigen Streifen schliessen. In anderen Fällen trugen wir denselben Untersuchungsstoff auch auf mehrere Streifen auf, und legten einen derselben auf eine mit E. coli geimpfte Wertmessungsplatte. Nach 30 Minuten wurde der Streifen entfernt und die Platte bei 37°C bis zum nächsten Tag inkubiert. Jenen Teil der parallelen Papierstreifen, an dessen entsprechender Stelle Bakterienwachstum in Erscheinung trat, teilten wir in 3 mm breite Schnitte auf und lösten dann die Schnitte einzeln mit 1 ml destilliertem Wasser in einer Mikroeprouvette aus.

Die Bestimmung des Wirkstoffgehaltes der Lösungen wurde in jedem Fall mit der Plattenmethode bei Anwendung des E. coli mutans Stammes von B. *Davis* durchgeführt [9]. Wir gingen im wesentlichen nach der Mitteilung von E. *Harrison* und Mitarb. vor, statt Petrischalen mit Anwendung der Grossplattenmethode, so wie es im II. Teil dieser Mitteilung ausführlich beschrieben wird.

Als Standardlösung benutzten wir die kristallinische B_{12} Vitaminlösung Merck in zwei 0,1, beziehungsweise 0,01 gamma/ml Konzentrationen. Bei der Auswertung haben wir pro Platte eine besondere Standard-Gerade mit Hilfe von zwei Punkten konstruiert ; für je einen Punkt nahmen wir den Mittelwert von fünf parallelen Messungen. Die Auslösungen der Papierschnitte wurden unverdünnt und nur auf einer Stelle gemessen, demzufolge haben wir die Ergebnisse nur als Vergleichswerte angesehen, die graphisch dargestellt die Verteilung der auf den Papierstreifen gebrachten Wirkstoffe veranschaulichten ; Kontrollversuche zeigten, dass man bei der Auslösung der Papierstreifen mit keinem Verlust zu rechnen hat.

Die bei den Versuchen benutzten kristallinischen B_{12} Vitaminlösungen wurden aus kristallinischem B_{12} Merck hergestellt. Gegenstand unserer Untersuchungen bildete die Originallösung, die wir bei Zimmertemperatur, von Licht nicht sonderlich geschützt aufbewahrten, ferner das von dieser Lösung mit Nitrogen-Durchblasung durch Beleuchtung gewonnene Hydroxocobalamin [11], beziehungsweise die mit KCN-Behandlung gewonnene Cyanocobalaminlösung [12, 13]. Die von uns untersuchten Leberinjektionen waren aus der Serienproduktion herausgenommene, beziehungsweise im Handelsverkehr besorgte Ampullen. Den rohen Leberextrakt haben wir so zubereitet, dass frische zerhackte Rindsleber mit Heisswasser ausgelöst und ohne jede Reinigung in Vacuum eingedickt wurde.

Ergebnisse

In dem auf Abb. 1 dargestellten Versuch liessen wir die unbehandelte kristallinische B_{12} Vitaminlösung in 10 gamma/ml Konzentration und das mit deren Photolyse gewonnene Hydroxocobalamin elektrophoretisch wandern.

Bei dieser, an der Kurve »a« dargestellten Wanderung fand sich der überwiegende Teil des Vitamins in 50—55 mm Entfernung von der Auftragungsstelle, was unter den gegenwärtigen Versuchsbedingungen für das Cyanocobalamin charakteristisch ist. Näher zur Auftragungslinie war aber ein anderes nied-

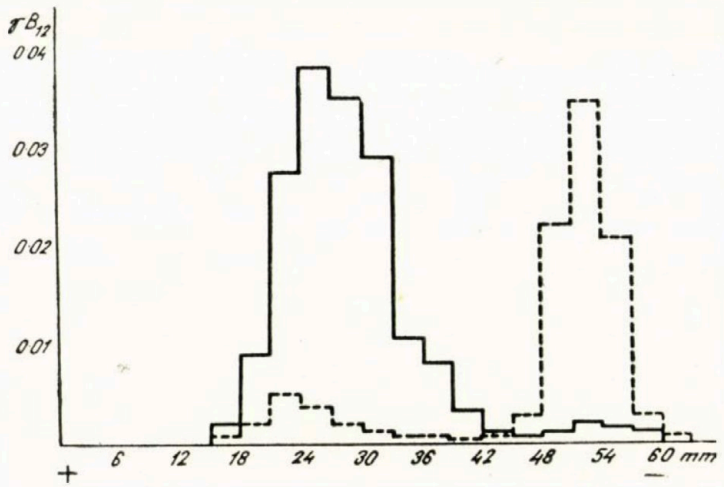


Abb. 1. a): - - - Cyanocobalmin
b): —— Hydroxocobalmin

rigeres Maximum zu finden, dass neben dem Cyanocobalamin auf die Gegenwart eines anderen Cobalaminkomponenten schliessen liess. Wir dachten in erster Reihe an das bei Lichtwirkung leicht entstehende Hyroxocobalamin und diese Annahme schien erwiesen zu sein, als wir nach elektrophoretischer Wanderung der beleuchteten Lösung die ganze Vitaminmenge von dieser Stelle zurückgewonnen hatten (Kurve »b«). Wenn wir mit der angegebenen Technik arbeiten, so dürfte nach unserer Meinung das bei der Kurve »a« erscheinende Hydroxocobalamin nicht während der Elektrophorese entstanden, sondern schon im untersuchten Präparat enthalten gewesen sein.

Während der elektrophoretischen Wanderung der mit freiem Auge verfolgbaren Lösungen in 1000 gamma/ml Konzentration, konnten wir beobachten, dass infolge Diffusion der Pufferlösung, auch ohne Einschaltung des Stromes, eine bedeutende Wanderung gegen die Mitte des Papierstreifens stattfindet.

Die Verschiebung während der Elektrophorese ist demnach die Resultante der elektrophoretischen und Diffusionswanderung. Um dies zu beweisen, brachten wir eine gemischte Hydroxo-cyanocobalaminprobe auf die Mitte des Papierstreifens, wobei wir die Erfahrung machten, dass das Hydroxocobalamin gegen die Anode, das Cyanocobalamin gegen die Kathode wandert. In dem an Abb. 2 dargestellten Versuch brachten wir die Hydroxo- bzw. Cyanocobalaminlösung auf die negative Seite der Papierstreifen. Es konnte festgestellt werden, dass in diesem Fall das Hydroxocobalamin schneller wandert, als das Cyanocobalamin. Während der Elektrophorese wandert also das Hydroxocobalamin gegen die Anode, das Cyanocobalamin gegen die Kathode; die

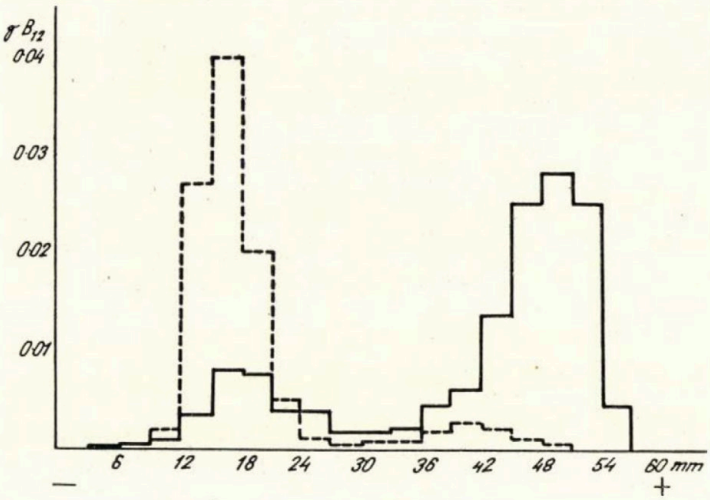


Abb. 2. a): —— Hydroxocobalamia
b): - - - Cyanocobalamin

Wanderung der auf den Rand des Papierstreifens getragenen Probe wird durch die Strömung der Pufferlösung in der Weise beeinflusst, dass sie die Bewegung in einer Richtung beschleunigt, in der entgegengesetzten Richtung verhindert.

Nach Klarlegung der Wanderungsverhältnisse der kristallinischen B_{12} Vitaminlösung, schritten wir zur Untersuchung der Leberextrakte. Abb. 3 zeigt das elektrophoretische Bild des auf 10 gamma/ml B_{12} Inhalt standardisierten Neoperhepars (KB 2 Versuchspräparat). Der überwiegende Teil des Wirkstoffes wurde von dem dem Cyanocobalamin entsprechenden Gebiet zurückgewonnen, eine flache Welle erschien auch in der Hydroxocobalaminzone. Nach KCN Behandlung verschwand diese Welle nicht, es trat im Gegenteil eine höhere Welle in Erscheinung. Bei Untersuchung einer Neoperheparprobe anderer Fabriksnummer fanden wir, dass es aus reinem Cyanocobalamin besteht, aber nach KCN-Behandlung erschien auch hier eine kleine

Welle am Rande der Hydroxo-Zone (Abb. 4). Ab. 5 stellt die elektrophoretische Kurve der Pernaemon forte Injektion Nr. 4492, 473 dar; die ver-

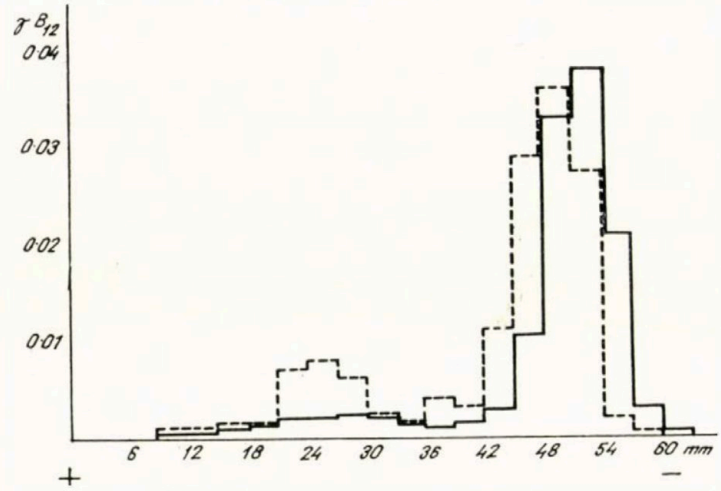


Abb. 3. a): —— KB2 Leberextrakt; *b):* - - - KB2 Leberextrakt + KCN

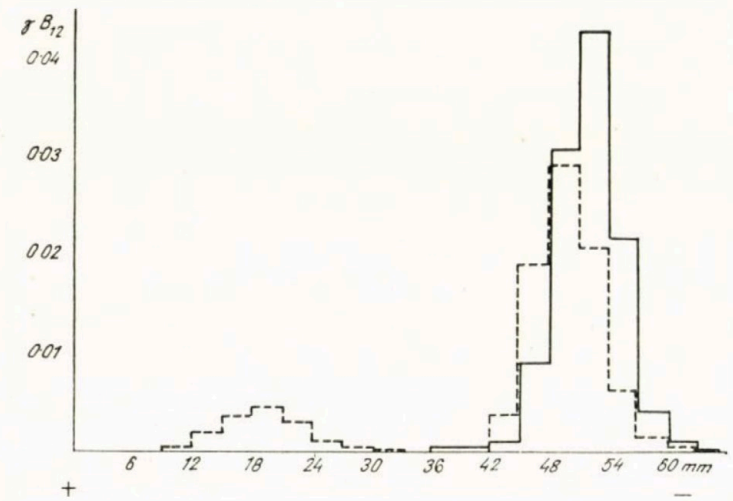


Abb. 4. a): —— Neoperhepar 12155
b): - - - Neoperhepar 12155 + KCN

hältnissmässig grosse Hydroxo-Zone verschwindet nach der KCN-Behandlung, es bleibt aber auch hier eine kleinere Welle zurück.

Nach der Elektrophorese des rohen Leberextraktes fällt es auf, dass die enzymatische, ohne KCN-Behandlung und ohne Lichtschutz hergestellte und

aufbewahrte Probe den Wirkstoff praktisch nur in Form von Hydroxocobalamin enthält (Abb. 6).

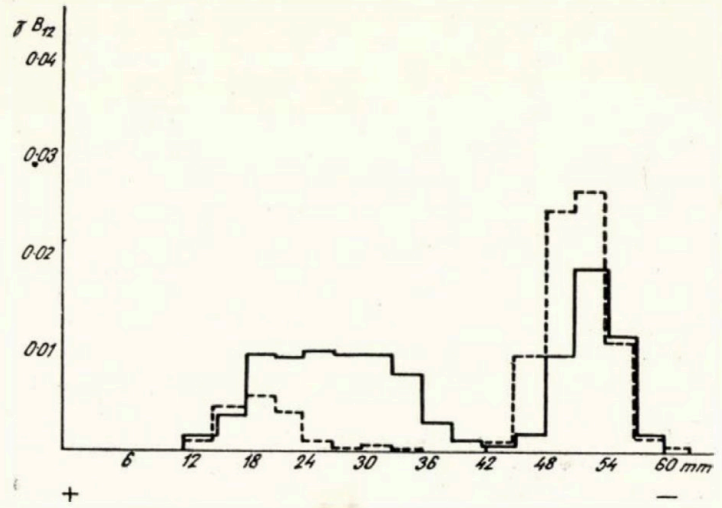


Abb. 5. a): —— Pernaemon 449.2473
b): - - - 449.2473 + KCN

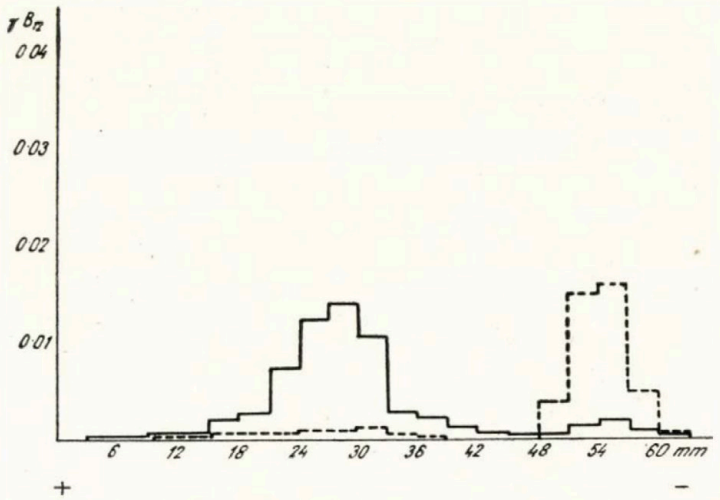


Abb. 6. a): —— Roher Leberextrakt; *b):* - - - Roher Leberextrakt + KCN

Die an der linken Seite der Hydroxocobalamin-Zone zurückbleibende, in ihrer Grösse wechselnde Welle war auch nach KCN-Behandlung der kristallinischen B_{12} Lösungen zu beobachten. Wir führten keine Versuche aus zur Erklärung dieser Erscheinung. Es ist aber unwahrscheinlich, dass wir mit

unverändertem Hydroxocobalamin zu tun hätten, da es häufig gerade nach der KCN-Behandlung zum Vorschein kommt. Es wäre eher anzunehmen, dass es sich um — von den pH Verhältnissen abhängig entstehendes — Dicyanocobalamin handelt.

Im Gegensatz zu unserer Erwartung gelang es weder in den mitgeteilten Fällen, noch im Laufe der Untersuchung weiterer, gereinigter Leberextrakte vom übrigen Teil des Papierstreifens einen auf Bakterien wirkenden Wachstumsfaktor nachzuweisen. Ebenso wenig führte es zum Ergebnis, wenn wir die Proben auf die Mitte des Papierstreifens, oder auf seine negative Seite brachten, um eventuell gegen die Anode wandernde aspezifische Stoffe nachzuweisen. Angenommen, dass wir die auf Bakterien wirkenden verunreinigenden Stoffe infolge ihrer niedrigen Konzentration nicht nachweisen konnten, müssen wir auch voraussetzen, dass die in den Extrakten vorhandenen Mengen das Resultat der Plattenwertmessung wesentlich zu beeinflussen nicht vermögen.

II.

Mit Hilfe der papierelektrophoretischen Methode gelang es nachzuweisen, dass Leberextrakte in beinahe allen Fällen, kristallinische B_{12} Lösungen aber von ihrer Aufbewahrung abhängig, mehr oder weniger Hydroxocobalamin enthalten. Es erhebt sich die Frage, inwiefern dieser Umstand die mit den Leberextrakten ausgeführten mikrobiologischen B_{12} Bestimmungen beeinflusst, d. h. ob es bei Anwendung gleicher Messverfahren eine wesentliche Abweichung zwischen der mikrobiologischen Wirkung vom Cyano- bzw. Hydroxocobalamin bestehe.

Literaturdaten, die sich auf diese Frage beziehen, stehen uns reichlich zur Verfügung. Die Ergebnisse sind aber grösstenteils nicht miteinander zu vergleichen, da sie von der angewandten Methodik — auch in Einzelheiten — weitgehend abhängig sind. *Rickes* und Mitarb. untersuchten in 1948 [14] die Wirkung des Hydroxocobalamins auf das Wachstum von L. dorneri und stellten ohne Mitteilung ihrer Methodik fest, dass sie der Wirkung des Cyanocobalamins entspricht. *Kaczka* und Mitarb. [11] untersuchten mit Hilfe von L. dorneri die Aktivität verschiedener Cobalaminkomponenten neben Cyanocobalamin Standard. Hydroxocobalamin ergab mit der Röhrenmethode niedrigere, mit der Plattenmethode ähnliche Werte. *Jackson* u. Mitarb. [15] untersuchten die Wirkung vom Hydroxocobalamin im Verhältnis zum Cyanocobalamin. Bei Anwendung der Röhrenmethode war die Wirkung mit L. dorneri identisch, mit L. leichmanii stärker ; Plattenmethoden, mit durch Sulfanilamid gehemmtem E. coli ausgeführt, zeigten keinen Unterschied zwischen den zwei Komponenten. *Harrison* und Mitarb. [10] berichten über ein Plattenbestimmungsverfahren mit E. coli mutans. Sie erwähnen, dass die verschiedenen Cobalamino-

komponenten nicht unbedingt von gleicher Wirkung sind, ihre Wirkungen können aber in kein zahlenmässiges Verhältnis gebracht werden. B_{12} a-c-d lieferten täglich wechselnde, nicht konsequente Ergebnisse, an einem und selben Tag ist der Regressionskoeffizient der verschiedenen Komponenten nicht identisch. *J. Roy Cohen* [16] fand bei Anwendung der Plattenmethode mit L. leichmanii, dass das Hydroxocobalamin höhere Werte ergibt, als das Cyanocobalamin.

Nach unseren vorherigen Feststellungen können die zur Wertmessung gelangenden B_{12} hältigen Extrakte grössere Hydroxocobalaminmengen enthalten. Bekanntlich ist das durch Fermentation gewonnene B_{12b} Vitamin ebenfalls mit dem Hydroxocobalamin identisch. Das Hydroxocobalamin dürfte also eine wesentliche Rolle darin spielen, dass die verschiedenen B_{12} Lösungen — von der Messungstechnik, oder vom benutzten Bakteriumstamm abhängig — sehr abweichende Werte liefern.

Frances E. [17] schreibt über die mit dem Stamm L. dorneri ausgeführte Plattenmethode, dass diese bei der Bestimmung von Fermentationsflüssigkeiten unwahrscheinlich hohe Werte ergibt und zwar mit den Ergebnissen der chemischen Methode verglichen, sogar das dreifache der letzteren. Nach den Versuchen von *Cuthbertson* [18] gibt die Plattenmethode mit L. dorneri im Falle von durch Fermentation gewonnenem B_{12} ebenfalls den 3—4fachen Wert der Röhrenbestimmung. Seines Erachtens ist die Plattenmethode bei diesen Proben nicht anwendbar.

Lens und *Wijmenga* [4] stellten aus der Bestimmung von Leberextrakten vor und nach der KCN-Behandlung fest, dass bei Anwendung der Röhrenmethode die KCN-Behandlung den Wert — vermutlich infolge der nicht aktivierenden, sondern stabilisierenden Cyanidwirkung — erhöht, dagegen erhielten sie bei der Plattenmethode mit L. dorneri häufig wesentlich geringere Werte nach der Behandlung. Nach spektrophotometrischer Kontrollmessung sind die niedrigeren Werte zu akzeptieren. Die Literaturdaten deuten einstimmig darauf hin, dass die Ergebnisse, vor allem der Plattenmessung, bei B_{12} Lösungen verschiedenen Ursprungs sehr abweichend sind. Gleichzeitig stellen sie aber auch fest, dass die einfache, leicht und schnell durchführbare Plattenmethode für Rutinbestimmungen unbedingt geeigneter wäre. Der Vorteil der Plattenmethode besteht auch darin, dass man die Proben ohne Sterilisierung einmessen kann, ausserdem ist die Wertmessung bei Verwendung von E. coli mutans statt Lactobacillen auf wesentlich einfacherem Nährboden mit einem solchen Stamm durchführbar, der durch die aspezifischen Stoffe weniger, durch die Oxydationsverhältnisse überhaupt nicht beeinflusst wird. Wir bestrebten uns daher in unseren Versuchen die Frage, — in erster Reihe in bezug auf die Plattenmethode — zu beantworten, inwiefern das Hydroxocobalamin die Verlässlichkeit der Messung beeinflusst.

Methodik

Wir führten die Messungen mit dreierlei Bakteriumstämmen, u. zw. mit L. lactis dorneri (ATCC 8000), L. leichmanii 313 (ATCC 7830) und mit Ultraviolettlicht bestrahltem E. coli mutans B. Davis aus. Im Falle von L. dorneri befolgten wir das von *Ivánovics* [19, 20] angegebene Verfahren. Mit L. leichmanii führten wir die Messungen nach *Robinson* und Mitarb. [1], mit E. coli mutans nach *Harrison* und Mitarb. [10] aus. Bei allen drei Methoden benutzten wir statt Petrischalen 15 × 30 cm grosse Glaskassetten, mit 140 ml Nährboden pro Platte. In dem erstarrenden Nährboden legten wir in fünf Reihen insgesamt 50 Löcher mit einem Korkbohrer von 7 mm ∅.

Sowohl der Standard, wie die zu untersuchenden Stoffe wurden in 2—2 Konzentrationen eingemessen. Als Standard benutzten wir eine Cyanocobalaminlösung von 0,1 bzw. 0,01 gamma/ml, und von dem zu untersuchenden Stoff womöglich die entsprechenden Verdünnungen. Je nach der Verdünnung wurden drei parallele Einmessungen gemacht, bei den Standardlösungen aber an 10 Stellen jeder Platte. Zur Ablesung benutzten wir einen mit Nadel versehenen »Schubler«, mit dem auch 0,1 mm grosse Differenzen ablesbar sind. Die Werte wurden auf Grund der Mitteilung *Harrisons* an einem Nomogramm berechnet

Unser Standard war die kristallinische B_{12} Vitamin-Lösung Merck; das während der Aufbewahrung gelegentlich entstandene Hydroxocobalamin wurde durch KCN-Behandlung wieder in Cyanocobalamin verwandelt. Die Ausführung der KCN-Behandlung war folgende: wir stellten aus der in 10 gamma/ml Konzentration aufbewahrten Standardlösung eine zehnfache Verdünnung mit KCN-Lösung her (1 mg KCN zu 9 ml dest. Wasser). Die so gewonnene Lösung, welche pro ml 1 gamma B_{12} Vitamin und 0,1 mg KCN enthielt, wurde bei 60°C 30 Minuten lang inkubiert. Bei der KCN-Behandlung der zu untersuchenden Stoffe sind wir in ähnlicher Weise vorgegangen, mit Herstellung einer Lösung von etwa 1 gamma/ml mit KCN-Lösung, so dass sie pro ml 0,1 mg KCN enthielt. Nach der Inkubation wurden mit dest. Wasser weitere 10- und 100fache Verdünnungen bereitet und die Einmessungen von diesen ausgeführt.

Die KCN Konzentration der auf die Platte gemessenen Lösungen betrug 0,01 bzw. weise 0,001 mg/ml. Vorversuche zeigten, dass das Wachstum der E. coli mutans, — oder Lactobacillen nicht einmal durch das fünfzigfache dieser Menge beeinflusst wird. Gleichfalls stellten wir fest, dass das Resultat sowohl im Falle reiner Lösungen, als roher Extrakte durch eine über 30 Minuten währende Inkubation mit KCN nicht beeinflusst wird.

Ergebnisse

Wir untersuchten mit den beschriebenen Methoden die mikrobiologische Wirkung sowohl des Hydroxocobalamin, als auch inländischer und ausländischer Leberextrakte vor und nach KCN-Behandlung. Hydroxocobalaminlösungen in 10,5 gamma/ml Konzentration, neben Cyanocobalaminstandard bestimmt, ergaben in jedem Fall die Wirklichkeit weit über treffende hohe Werte. Gleichfalls höhere Werte erbrachte eine etwa fünf Monate lang aufbewahrte Standardlösung, die elektrophoretisch untersucht, einen ungefähr 20%igen Hydroxocobalamingehalt ergab (Tabelle I).

Hydroxocobalamin weist also, wie die Serienmessungen zeigen, mit E. coli mutans ungefähr zweimal, mit Lactobazillen dreimal höhere Werte als Cyanocobalamin auf. Die Messungen nach KCN-Behandlung erbrachten in allen Fällen den Beweis, dass es sich um eine an die Hydroxocobalamin-Formel gebundene gesteigerte Wirkung handelt.

Die Messungsergebnisse von Leberextrakten sind in Tabelle II. zusammengestellt.

Messungen vor der KCN-Behandlung, vor allem bei längere Zeit aufbewahrten Präparaten, geben wesentlich höhere Werte, als die nach der Behand-

Tabelle I

Bestimmung kristallinischer Cobalaminlösungen mit den Bakterienstämmen L. dorneri, L. leichmannii und E. coli mutans vor und nach KCN-Behandlung

	L. dorneri	L. leichmannii	E. coli mutans	
Hydroxocobalamin 10,5 gamma/ml	32,0	32,0	19,0	21,0
		27,0	21,6	21,4
		32,5	19,9	21,6
		28,0	21,8	
Hydroxocobalamin 10,5 gamma/ml. + KCN	10,7	11,2	10,5	
		10,6	10,9	
Cyanocobalamin 5 monatiger Standard 10,0 gamma/ml	—	13,0	11,5	
			11,7	
Cyanocobalamin 5 monatiger Standard 10,0 gamma/ml + KCN	—	10,0	10,0	
			10,1	

Tabelle II

Bestimmung des B_{12} Gehaltes in Leberextrakten mit den Bakterienstämmen L. dorneri, L. leichmannii und E. coli mutans vor und nach KCN-Behandlung

	L. dorneri		L. leichmannii		E. coli mutans	
	—	+KCN	—	+KCN	—	+KCN
1. Neoperhepar 10/I	—	—	10,0	8,80	9,80	9,00
2. Neoperhepar 10/II	—	—	9,70	9,50	9,70	9,20
3. Neoperhepar 10/III	9,80	9,70	9,70	10,0	10,80	10,60
4. Neoperhepar 5/I	—	—	8,80	5,70	7,40	5,80
5. Neoperhepar 5/II	—	—	6,40	3,76	4,26	3,24
6. Campolon	—	—	11,80	5,10	7,50	4,92
7. Pernaemon forte I.	20,30	9,70	22,50	10,10	16,50	10,05
8. Pernaemon forte II	—	—	—	—	12,80	10,10
9. Ungereinigter Leberextrakt	14,20	5,25	13,05	5,10	7,15	4,60

1., 2., 3. = aus der laufenden Produktion stammendes, auf 10 gamma/ml eingestelltes Präparat.
4., 5. = seit 18 Monaten aufbewahrtes, auf 5 gamma/ml eingestelltes Präparat.
6., 7., 8. = Vom Handelsverkehr besorgtes Präparat.

lung ausgeführten Bestimmungen. Die selben Präparate zeigen, mit den verschiedenen Bakterienstämmen gemessen, vor der KCN-Behandlung sehr beträchtliche Messungsdifferenzen, während nach der KCN-Behandlung diese Differenz verschwindet und bei Rohpräparaten wesentlich geringer wird.

Diese Erscheinung können wir damit erklären, dass jene Substanzen, die vor der KCN-Behandlung wesentlich höhere Werte gaben, grosse Menge von Hydroxocobalamin enthielten. Dem Hydroxocobalamin gegenüber sind die verschiedenen Bakterienstämme in verschiedenem Masse empfindlich, die Messungsdifferenzen bei den unbehandelten Proben sind also erklärlich. Nach der Behandlung stimmen die mit den drei Bakterienstämmen gewonnenen Ergebnisse gut überein, was für die Richtigkeit der aus dem Resultat der elektrophoretisch ausgeführten Versuche gezogenen Folgerungen spricht, dass nämlich aspezifische Stoffe keine von den angewandten Bakterien abhängigen wesentlichen Messungsdifferenzen erzeugen, höchstens bei Rohextrakten und auch bei diesen nicht in solchem Masse, wie es bisher angenommen wurde.

Der Vergleich unserer Ergebnisse mit den Literaturdaten bestätigt die Feststellung von *Frances* und *Cuthbertson*, dass bei Bestimmung von Fermentationsflüssigkeiten mittels der Plattenmethode, hohe Werte gewonnen werden. Diese Tatsache kann mit der Beobachtung von *Lens* und *Wijmenga* gut in Parallele gestellt werden, dass Leberextrakte nach KCN-Behandlung — mit der Plattenmethode gemessen — geringere Werte ergaben. Die von *Harrison* beschriebenen Messungsschwierigkeiten konnten wir nicht beobachten, nur eine Unsicherheit in der Messung von Hydroxocobalamin in dem Sinne, dass bei den nach mehreren Monaten wiederholten Messungen die Differenzen das oben beschriebene zwei- bis dreifache Mass nicht erreichten. Während einer längeren Versuchsperiode konnten wir also die Multiplikationszahl des Hydroxocobalamins im Verhältnis zum Cyanocobalamin nicht als konstant ansehen, sie schwankte z. B. im Falle von E. coli zwischen 1,5 und 2,1. Diese Änderung dürfte mit irgend einer Verunreinigung des Nährbodens in Zusammenhang stehen.

III.

Wenig gereinigte Extrakte (Fermentationslösungen, oder Leberextrakte) geben mit der Plattenmethode im allgemeinen höhere Werte, als das kristallinische B_{12}, vermutlich infolge des Hydroxocobalamin-Gehaltes. Führt man die Messung mit der Röhrenmethode aus, so geben die Rohextrakte wesentlich geringere Werte, als im Falle wenn die Probe mit dem wertmessenden Nährboden zusammen ohne Zugabe von Schutzstoffen, — Thioglykolsäure oder KCN, sterilisiert wird. Es war naheliegend anzunehmen, dass für die, auf Wärmewirkung auftretende Wertverminderung der Gehalt an zersetzlichem Hydroxocobalamin verantwortlich sei, und die Schutzwirkung des Cyanids auf der Umwandlung in stabilere Cyanocobalamin beruhe.

Da wir imstande waren die Gegenwart vom Hydroxocobalamin durch die im II. Teil beschriebene doppelte Messung (vor und nach der Cyanbehandlung) in einfacher Weise festzustellen, untersuchten wir die Frage, welche Änderung auf Wärmewirkung das Cyano- bzw. Hydroxocobalamin in dem von *Hoffmann* [21] angegebenen flüssigen Nährboden erleide.

Methodik

Der Nährboden enthält 0,02 g/100 ml Thioglykolsäure. In unserer zweiten Versuchsreihe wurde dies durch 0,25 gamma/ml KCN ersetzt; der Nährboden der Kontrollreihe enthielt keine dieser Substanzen.

Wir gaben in unseren Versuchen von der 2 gamma/ml Hydroxo- bzw. Cyanocobalaminlösung gleiche Mengen zum doppelt konzentrierten Nährboden, hielten die Lösungen auf siedendem Wasserbad bei 100°C und entnahmen Proben nach 5—10 usw. Minuten. Die Proben wurden bis zur Bestimmung an schmelzendem Eis gehalten und die Bestimmungen vor und nach der KCN-Behandlung mit der im II. Teil beschriebenen mit E. coli mutans ausgeführten Plattenmethode unternommen. Als effektiven B_{12} Gehalt nahmen wir den nach der KCN-Behandlung gemessenen Wert an, und aus dem Vergleich der zwei Bestimmungen vor und nach der Behandlung konnten wir im gegebenen Zeitpunkt auf das Verhältnis der im Nährboden enthaltenen Cyano- bzw. Hydroxocobalaminmengen schliessen.

Ergebnisse

Laut Tabelle III und IV fällt die Aktivität des Hydroxocobalamins in einem ohne Stabilisator hergestellten Nährboden bei 100° C zuerst steil, dann nur allmählich herab. Thioglykolsäure bzw KCN verhindert den ersten steilen Sturz, eine sukzessive Verminderung der Aktivität ist aber auch weiter zu beobachten. Im Falle von Cyanocobalamin sahen wir erst von der 30. Minute an eine mässige Wertverminderung; bei Thioglykolsäure bzw. KCN tritt während der Versuchszeit keine Verminderung auf.

Tabelle III

Wertänderung vom Hydroxocobalamin im Hoffmannschen Nährboden bei 100°C

		0′	5′	10′	30′	40′	60′
Ohne Stabilisator	vor KCN	18,0	10,20	7,95	7,25	6,30	6,25
	nach KCN	9,90	5,82	5,10	4,60	4,10	3,85
0,02% Thioglykolsäure ..	vor KCN	17,0	16,70	16,40	14,60	—	—
	nach KCN	10,0	9,90	9,50	9,20	—	—
25 gamma % KCN	vor KCN	16,5	16,0	15,0	13,80	—	—
	nach KCN	9,80	9,7	9,5	8,10	—	—

Tabelle IV

Wertänderung von Cyanocobalamin im Hoffmannschen Nährboden bei 100°C

		0′	5′	10′	30′	40′	60′
Ohne Stabilisator	vor KCN	9,80	13,20	14,80	17,0	16,7	16,0
	nach KCN	9,50	9,80	9,80	9,7	9,2	8,9
0,02% Thioglykolsäure ..	vor KCN	9,90	12,0	12,60	12,8	—	13,0
	nach KCN	9,40	9,20	9,70	9,80	—	10,1
25 gamma % KCN	vor KCN	9,90	9,90	9,90	10,50	—	10,6
	nach KCN	9,50	10,30	9,80	9,50	—	9,6

Die von uns beobachtete rasche Wertverminderung des Hydroxocobalamins dürfte der von *Skeggs* [23] beobachteten Erscheinung entsprechen, welche die Autorin damit erklärte, dass es zwischen dem Hydroxocobalamin und irgend einem Bestandteil des Nährbodens eine Bindung entsteht und ein mikrobiologisch inaktiver Stoff gebildet wird. Die stabilisierende Wirkung der Thioglykolsäure beruht also darauf, dass sie diese Bindung verhindert. Die stabilisierende Wirkung des KCN wurde bisher so erklärt, dass es das Hydroxocobalamin in stabileres Cyanocobalamin verwandelt. Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, dass diese Umwandlung nicht zustande kommt. Die Wirkung so kleiner Mengen von KCN ist demnach, ähnlich der Thioglykolsäure mit der Verhinderung der Bindung zu erklären.

Cyanocobalamin ohne Zugabe eines Stabilisators verwandelt sich beinahe völlig in Hydroxocobalamin, eine Wertverminderung stellt sich erst nach dieser Umwandlung ein. Thioglykolsäure und KCN verhindern die Umwandlung teilweise, bzw. völlig, so wird auch die Wertverminderung ausgeschlossen, oder verzögert.

Es ist sonderbar, dass das vom Cyanocobalamin gebildete Hydroxocobalamin nicht mit der beim Hydroxocobalamin zu erwartenden Wertverminderung einhergeht; es hat den Anschein, als ob die aus Cyanocobalamin frei gewordene Menge von CN ausreichen würde zur Verhinderung der raschen Inaktivierung.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Unter den von uns untersuchten, im Handelsverkehr befindlichen B_{12} Vitaminpräparaten enthalten nicht nur die Leberextrakte, sondern auch die kristallinischen B_{12} Lösungen neben dem Cyanocobalamin stets bedeutende Mengen von Hydroxocobalamin.

2. Cyanocobalamin — in der von uns benützten pH 8,6 Pufferlösung, mit Papierelektrophorese untersucht — wandert gegen die Kathode, das Hydroxocobalamin gegen die Anode.

3. Bei Vergleich der mikrobiologischen Aktivität vom Cyano- und Hydroxocobalamin mittels der Plattenmethode ergab Hydroxocobalamin mit E. coli etwa zweimal, mit Lactobazillen gemessen etwa dreimal höhere Werte. Demzufolge sind wir imstande, vom Resultat der zwei, vor und nach der KCN-Behandlung ausgeführten Messungen auf den Hydroxocobalamingehalt des untersuchten Stoffes zu folgern.

4. Durch Zwischenschaltung der KCN-Behandlung bei den zu untersuchenden Stoffen wurde ein wesentlicher Fehler der Plattenmethode ausgeschaltet. Das modifizierte Verfahren ist zur Feststellung des Wirkstoffgehaltes gereinigter Leberextrakte völlig geeignet.

5. An Hand der mit Lactobazillen ausgeführten Röhrenwertmessung wird ein beträchtlicher Teil des mit dem Nährboden zusammen im Autoklav sterilisierten Hydroxocobalamin inaktiviert. Thioglykolsäure, oder KCN verhindern diese Inaktivierung. Eine gewisse Wertverminderung beim Hydroxocobalamin ist aber auch in Gegenwart der erwähnten Stoffe zu beobachten, was beim Cyanocobalamin nicht der Fall ist.

6. Die stabilisierende Wirkung des KCN im Nährboden in der Gegenwart von Hydroxocobalamin beruht nicht auf Umwandlung des letzteren in Cyanocobalamin.

LITERATUR

1. *Robinson F. A., B. W. Williams, L. H. Brown :* J. of Pharm. Pharmacol. **4** 1952. 27.
2. Bent. Noer. Dansk Tidskr. f. Farmaci **25**. 1951. 222.
3. *Francois Patte M. :* Ann. Pharm. Fran. **12**. 1951. 747.
4. *Lens I., H. G. Wijmenga :* Biochem. et Biophys. Acta **8**. 1952. 56.
5. *Winsten W. A., E. E gen :* J. Biol. Chem. **177**. 1949. 989.
6. *Schwietzer H., A. Wittern :* Arzneimittel-Forschung **4**. 1952. 185.
7. *Ericson L. E., Z. G. Bánhidi, G. Gasparetto :* Acta Chim. Scand. **6**. 1952. 1131.
8. *Grassmann u. Hannig :* Naturwiss. **37**. 1950. 496.
9. *Davis B. D., E. Mingioli :* J. Bact. **60**. 1950. 17.
10. *Harrison E., K. A. Lees, F. Wood :* Analyst. **76**. 1951. 696.
11. *Kaczka E. A., D. E. Wolf, F. A. Jr Kuehl, K. Folkers :* Science **112**. 1950. 354.
12. *Veer W. L. C., I. H. Edelhausen :* Biochim. et Biophys. Acta. **6**. 1950. 225.
13. *Wijmenga H. G., W. L. C. Veer, J. Lens :* Biochim. et Biophys. Acta **6**. 1950. 229.
14. *Rickes E. L. :* Science **108**. 1948. 634.
15. *Jackson W. G., G. B. Whitfield, W. H. de Vries, A. Harrison :* J. Am. Chem. Soc. **73**. 1951 337.
16. *Roy Cohen J. :* Abstracts Am. Chem. Soc. 119th meeting, 1951.
17. *Frances E., R. E. Larkin, Stuckey :* Analyst. **76**. 1951. 150.
18. *Cuthbertson W. F. J., H. F. Pegler, J. T. Lloyd :* Analyst. **76**. 1951. 133.
19. *Ivánovics Gy., L. Alföldi :* Orvosi Hetilap **52**. 1951. 1684.
20. *Ivánovics Gy. :* Persönliche Mitteilung.
21. *Hoffmann C. E., E. L. R. Stokstad, B. L.Hutchings, A. C. Dornbusch, T. H. Jukes :* J. Biol. Chem. **181**. 1949. 635.
22. *Cooperman J. M., R. Drucker, B. Tabenkin :* J. Biol. Chem. **191**. 1951. 135.
23. *Skeggs H. R. :* Abst. Am. Chem. Soc. 119th meeting, 1951.

ИССЛЕДОВАНИЕ КОЛИЧЕСТВА ВИТАМИНА B_{12} В ЭКСТРАКТАХ ПЕЧЕНИ ПРИМЕНЕНИЕМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Э. Череи-Пехань, Б. Мольнар

Резюме

Экстракты печени и растворы кристаллического витамина B_{12} могут содержать незначительное количество гидроксокобаламина, выявляемого применением электрофоретического метода. Применяя буферный раствор pH 8,6, цианокобаламин передвигается в направление катода, а гидроксокобаламин в направление анода. Если исследуемое вещество нанесено на край бумажной ленты, буферный раствор дифундирующий к середине ленты несет обе фракции кобаламина в то же направление. Однако, исходя от анода цианкобаламин движется быстрее, а исходя от катода замечается более быстрое движение гидрокобаламина (см. рис. 1—2). Экстракты печени могут содержать различ-

ное количество гидроксокобаламина в зависимости от способа изготовления и хранения. Обрабатывая гидроксокобаламин цианистым калием, можно превратить его в цианокобаламин (рис. 5—6).

Количество гидроксокобаламина при микробиологическом определении важно потому, что при применении пластиночного метода измерения с E coli mutans гидроксокобаламин дает результат, два раза выше чем цианкобаламин, а в исследованиях с лактобациллами, — результат, три раза выше (см. таблицу I). Потому исследуемые вещества надо перед измерением обработать цианистым калием, чтобы все количество кобаламина превратилось в цианокобаламин. Таким образом авторам удалось устранить значительные ошибки впрочем простого и быстрого пластиночного метода и осуществить надежное измерение количества действующего вещества в экстрактах печени (см. таблицу II). Количество гидроксокобаламина в растворе можно определить из разницы двух результатов, полученных измерением перед обработкой цианистым калием и после ее.

В ходе определения проведенного с лактобациллами в автоклаве инактивируется значительная часть гидроксокобаламина. Тиогликольная кислота или цианистый калий препятствуют инактивированию гидроксокобаламина; цианистый калий не вызывает образования устойчивого цианокобаламина. Если цианокобаламина в питательной среде без стабилизаторного средства подвергаем действию температуры, то он превращается в гидроксокобаламин (см. таблицу 3—4).

CONTRIBUTIONS TO THE BIOLOGY OF QUANTITATIVE CHANGES IN ANTIBIOTIC PRODUCTION, BASED UPON INVESTIGATIONS ON A STREPTOMYCES SPECIES*

By
J. HORVÁTH

Biological Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences, Department of Microbiology Tihany

Received July 31, 1953

Investigating a Streptomyces species isolated from an unknown soil, an antibiotic effect on Gram-positive and Gram-negative bacteria could be established. — However, when examining this effect *in vitro*, the amount of active substance yielded proved small. This of course made it difficult to produce a sufficient quantity of the active substance for the purposes of further investigations. It was natural that first of all the possible absence of precursors was taken into consideration, yet it was not possible to obtain a higher yield even when employing the most varied and richest nutrient media. Nor was it of any avail to use surface and submerged cultures in a diversified manner. On the other hand, results could be obtained by treating the Streptomyces species itself in different ways, of which the following account is rendered.

a) *By irradiation.* As is known, *Backus*, *Stauffer* and *Johnson* succeeded in developing a Penicillium chrysogenum strain of great yield by ultraviolet irradiation (cit. Lee 1951). *Savage* (1949), *Dulaney*, *Ruger* and *Hlavac* (1949) obtained by the same means higher yielding Streptomyces griseus. On the basis of these results it was attempted to raise the antibiotic production of the present Streptomyces species by artificial sunlight irradiation, in the following way. The Streptomyces was made to spore on an asparagine-dextrose-agar culture medium. The spores were suspended in sterile tap water and spreads made on a *Waksman-type dextrose-peptone-meat extract-agar* medium in Petri dishes. In making the smears, the spores remained on top of the culture plates, the water not covering the surfaces. The spores prepared for irradiation were kept at a temperature of 21° and irradiated in the first, second, and third hour subsequent to smearing. This was done in the following manner. A quartz plate was built into the top part of an incubator. Having sterilized the Petri dishes by steam, they were placed inside the incubator with their covers off, directly beneath the window, a quartz lamp was installed (Original Hanau, Jubileums-Höhensonne, S 300). The distance between it and the Petri dishes was invariably 14 cm. The spores in the individual Petri dishes were subjected to irradiation

*Lecture delivered at the meeting on May 25, 1951, of the Section for Biological Sciences of the Hungarian Academy of Sciences.

for 6 minutes. During irradiation, a constant flow of air was maintained with the aid of a ventilating fan in the space between the quartz plate and the quartz lamp, to prevent the air growing warm. After irradiation, the Petri dishes were put into an incubator of 32° C, and kept there until fairly large-sized colonies developed from the individual spores. From the colonies grown in the middle of the plates those developing perceptibly well were selected, inoculated on a slant agar culture medium, and there propagated.

b) *By raising productive vitality through frequently repeated inoculation.* Yields of antibiotics obtained from culture fluids aerated with an horizontal shaker indicated that, on an average, maximum production is reached on the

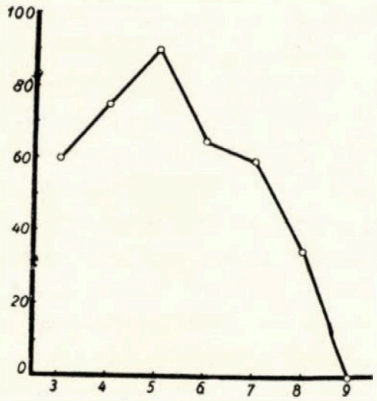


Fig. 1. Ordinate, rate of production in per cents, maximum production 100 per cent. Abscissa, number of days

third day after inoculation, from which time onward production stops altogether and the substance begins to decompose. By the fourth day following the peak of production, decomposition is complete. Fig. 1 is a diagram showing the production results of one of the experiments. In essence, this is at the same time the diagram of that preliminary experiment which led to the introduction of the method mentioned in the superscription to this section. The yield shown in this diagram was obtained from a culture fluid prepared by the following method. Thin agar plates were prepared, under sterile conditions, into Erlenmeyer flasks and inoculated with the spores of the Streptomyces species in question, then placed into an incubator of 32° C. After two days' incubation, again under sterile conditions, 200 ml of a glucose-corn-steep-liquor medium were added to each, put into shakers, and left at room temperature (26° C). Antibiotic production of the cultures was controlled daily by current biological assays. One of the cuspidate curves, plotted on this basis, is shown in Fig. 1.

A study of the yields obtained with this method leads to the conclusion that the active agent is being produced in the first half of the culture process.

From this — as a possible means of raising production —, it was inferred that if by passaging it every fourth day this strain were kept on an agar plate on the level of its maximal production, it would have to unfold greater yielding vitality than if propagated from spores at greater intervals. This is why in the interest of possibly achieving higher yields frequent passages were applied.

c) *By experimental refrigeration.* In soil bacteriology it is a well-known fact that the number of bacteria suddenly increases upon the effect of frost. Some investigators hold that on the effect of frost the individual colonies in the soil probably disintegrate and this is the reason why more colonies, i. e. a greater number of bacteria can be demonstrated. Proceeding from the assumption that frost must be rather suitable for the selection of the most resistant strains which will be capable of higher antibiotic production, the following experiment was carried out. Spores were inoculated on a full value culture fluid and incubated at 32° C for 7 days, then distributed under sterile conditions into 6 flasks of a capacity increasing in steps of 50 ml. Three of them, holding half of the experimental substance, were kept at 32° C, while the other three were placed into a refrigerator of —27° C for the duration of 2 hours ; in other words, the mycelia of the Streptomyces were abruptly refrigerated from room temperature. In another series of experiments the Streptomyces culture fluid, meant to be frozen slowly was placed into a refrigerator before this was started and then it was cooled down gradually to —27° C. As regards results, which are to be discussed below, there was no difference to be observed in the two procedures.

Measuring of the quantities of antibiotic produced

Two different methods were applied. The first consisted in the daily passaging of the test organism, a Staphylococcus aureus isolated in our laboratory. From the one-day cultures nephelometrically determined quantities of bacteria were suspended in sterile physiological saline. The suspensions were transferred to an agar medium cooled to 43° C, mixed with it, and poured into Petri dishes. When the agar nutrient solidified, holes were made in it with a cork borer in the usual manner, into which a culture previously purified and sedimented by centrifuging was pipetted. Placing the preparation into an incubator of 37° C, in 12 hours the inhibition zone arising in consequence of diffusion was well perceptible. The second method was much simpler, yet very important from the point of view of this particular experiment. A known quantity of the Staphylococcus suspension was mixed according to the above described method with an agar nutrient on the point of solidifying, and adjusted to pH 6,5. This mixture was then poured into Petri dishes. As soon as the nutrient agar solidified, as much of the mycelium of Streptomyces was inoculated on its surface as a platinum-

wire loop would hold. By mass scale experiments it was then established that colonies, which developed from mycelia inoculated on agar infected with Staphylococcus, or, for that matter, with B. subtilis from Streptomyces cultures of the same age, invariably give rise to inhibition zones of one and the same diameter. In other words, more or less substantial differences in size of the colonies have no influence upon the diameter of the inhibition zones. Yet in other words, members of identical strains produce identical quantities of antibiotics. Evidently, this method supplied a good basis for comparing the results obtained from differently treated strains. (It should be mentioned that a similar method had been applied by *Duggar* in his preliminary experiments with Streptomyces aureofaciens. See *Duggar* 1949.)

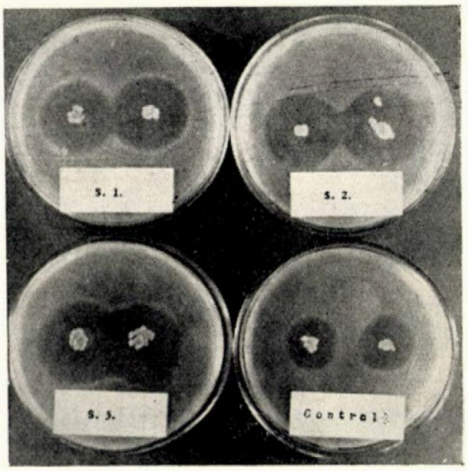
Experimental results

In the following, only the results achieved by the above described simple methods will be dealt with. The surface and submerged cultures, having never given uniform yields within any one strain, are unsuitable for the demonstration of differences in the production of differently treated strains. No answer is available to the question, what basic facts must be known to enable us influencing quantitative production, unless we are in possession of a simple method permitting of mass application to measure that production. It is believed that the uncomplicated procedure described in the present paper will be found suitable.

By frequent passages a level of production was attained which it was desired to increase, for it was still found to be insufficient for the aims set. Ultraviolet irradiation was resorted to. The enclosed photograph No. 1 shows that the colonies from the irradiated and unicellular (clone) cultures marked s. 1, s. 2, and s. 3 reveal a considerably larger inhibition zone than the non-irradiated strain (which in the photograph is inscribed »control«). On proceeding to compare the inhibition zones measured in millimeters with the controls it will be found that the increase amounts to about 40 per cent. It is known from other experiences, however, that the increase in concentration is not this simply interconnected with the rise expressed in millimeters. Unfortunately, at the time of the experiment there was no sufficient amount of the pure active agent available for furnishing actual values, wherefore the increase in production could only be given as a ratio expressed in millimeters. Concerning the irradiated strains, it needs mentioning that the one marked s. 1 had been pretreated by the spores spread over the agar having been kept for one hour in the incubator at 32° C, while strain s. 2 had been incubated for two, and s. 3 for three hours prior to irradiation. Also, it must be stated that the incubation period did not to any measurable or appraisable extent influence the rate of increase in yield, as can be seen in photograph No. 1.

The question arose whether the irradiation-induced increase in production was of a lasting nature, or liable to regression after some time. Inoculating the strains once a week, from the day of irradiation onward, it was found that production began to fall back gradually, and that by the fourth or fifth month it did not exceed that of the initial laboratory strains. As a matter of fact, this finding agrees with the observations of the authors mentioned in the introductory part of this paper.

Another problem examined was whether the mycelium treated whith frequent passages increased production. The yields of the strains passaged



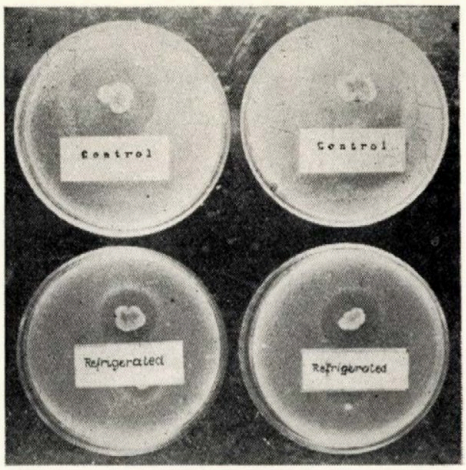
Photograph No. 1 : Direct testing, on agar inoculated with Staphylococcus aureus, of Streptomyces samples cultured from irradiated spores after an incubation time of 1, 2 and 3 hours, respectively. The samples treated with frequent passages serve as controls

every fourth day were carefully checked and noted, and it was found that production, increasing gradually, was 50 per cent higher at the time of the 14th passage, but then stopped rising altogether. Evidently, this mode of treatment secured high-level production for a longer period than did the method of irradiation. The strains passaged at four day intervals did not lose their capacity of maintaining production on a high level even when they had repeatedly been made to spore on a culture medium (asparagine, glucose-agar). Nor did the rate of production decrease following.

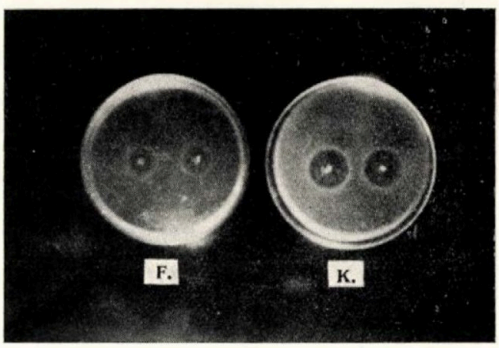
It has been outlined above why refrigeration was included among the methods used for increasing the production of active antibiotic substance. Both, the strain induced by frequent passages to secure a 50 per cent rise in yield and the original strain, were subjected to refrigeration. Following it, no change whatsoever was established in the production level of the latter, whereas

with the former this level fell back to that of the initial strain. These changes can be seen in photographs Nos. 3 and 4.

The duration of the effect of refrigeration was also examined. After treatment with repeated passages, refrigerated strains again produced a higher



Photograph No. 2: Streptomyces culture pre-treated with refrigeration and inoculated with Staphylococcus on agar. The sample treated with frequent passages serves as control



Photograph No. 3: Streptomyces culture pre-treated with refrigeration inoculated with B. subtilis on agar (F); the sample treated with frequent inoculation serves as control (K)

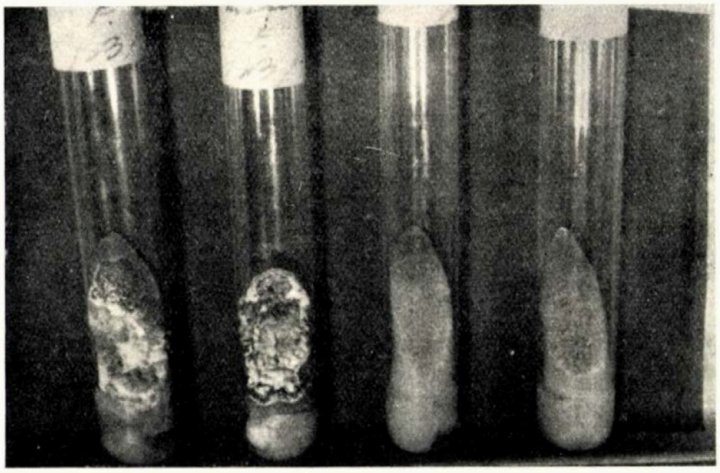
yield. If they were transoculated once a week from one agar medium to another of the same composition, for a period comprising 8 or 9 weeks, the pre-refrigeration level of production was regained.

Finally, it was not uninteresting to observe how the differently treated strains behaved with regard to spore formation. First of all, it could be established that all strains, no matter how they had been treated, formed spores

at an equal rate on a culture medium known to be generally favoured by Streptomyces for that purpose, e. g. on asparagine-glucose-agar. Secondly, it was found that on a potato block spore formation is very marked in refrigerated strains until after a few passages, while irradiated strains form no spores at all, and those frequently passaged, only slightly or not at all. Photograph No. 4 shows a refrigerated strain with pronounced spore formation, and a frequently inoculated one without any signs of it.

Discussion

With the above described three methods it has been attempted to raise the production of antibiotics in a certain Streptomyces species. Good results



Photograph No. 4: Streptomyces inoculated on potato block and pre-treated with refrigeration (two test tubes on the left), and samples treated with frequent passages (two test tubes on the right). Abundant spore formation easily discernible in two test tubes on the left

have been obtained by frequent passages, even better ones by treating the spores with ultraviolet irradiation, while refrigeration has produced effects to the contrary, throwing back to the initial quantitative production level those strains that had been irradiated or treated with frequent passages.

The effect of refrigeration also deserves attention for the fact that, on the one hand, marked spore formation on a potato block and, on the other hand, reduced production of antibiotics proved to be the consequences of it. The phenomenon, too, appears to be worthy of notice that treatment with frequent passages makes the refrigeration effect disappear, i. e. the production of active substance rises, while a decrease in the capacity to form spores on

a potato block is observable, which capacity is lost completely after a certain time. Consequently, in the experiments there was a direct correlation between the reduction in the capacity for spore formation and the rise in the quantity of active substance. With microorganisms, spore formation generally sets in at a time when external circumstances begin to become unfavourable for their activity. Thus, it really is one way of escaping the effect of adverse environmental conditions. That upon the effect of refrigeration the sensitivity of the Streptomyces species to environmental conditions increased, is proved by the fact that after refrigeration it showed a marked spore formation on a potato block, whereas the control did not. In this case, the potato block, too, represents unfavourable external conditions which, however, can only assert themselves against the refrigerated strains that became more sensitized, whereas the strains of reduced sensitivity (those irradiated or treated with frequent passages) do not form spores at all.

The interrelation between increase in antibiotic production and decrease in spore formation led to the presumption that the latter ensued because the sensitivity of the strain to all environmental influences, and thus also to its own metabolic product (antibiotic), became intensified. In trying to confirm this presumption the following experiment was carried out. To a culture fluid as much was added of the antibiotic produced by the Streptomyces strain as it maximally produced under identical culture conditions on the identical culture medium. Another medium was prepared for control purposes, containing the same constituents, but no active agent. Both these cultures were then inoculated with the mycelia of the Streptomyces and aerated by means of a shaker. The result obtained showed that in the culture fluid to which active substance had been added quantitative production did not rise above the production by that substance itself, whereas the yield obtained in the control culture was in agreement with that expressed by the production curve in Fig. 1. In other words, the Streptomyces species did not produce more than the quantity to which it was not yet sensitive.*

By concentrating its own active agent (measured by simple diffusion tests) it is also possible to inhibit growth in the experimental Streptomyces. This is obvious, since the differences in antibiotic production between the three strains — the irradiated, the refrigerated, and the one treated with frequent passages — are due just to the fact that their sensitiveness to their own metabolic products also differs.

By means of frequent passages it has been established that the Streptomyces used in the experiments remained in constant touch with its own anti-

* Nearly simultaneously with the publication of the results presented in this paper, *Mac Daniel* et al. reported that on treatment with streptomycin the Streptomyces griseus developed resistance against its own effective ingredient and at the same time increased its streptomycin yield. The same conclusion was arrived at in the Soviet Union in connection with the debate initiated by *Kudryavtzev* (*v. Horváth* 1953. and *Microbiologiya* [russian] 1952.).

biotic, whereby its sensitiveness to the active agent became reduced. An intensified desensitizing effect was also attained by means of irradiation. Refrigeration, on the other hand, restored the original level of sensitivity.

The statement seems to be justified that in the above described experiments one of the possible means has been found by which to attain higher yields in the production of antibiotics. To sum up briefly, the sensitiveness of microorganisms to their own metabolic products need be overcome in order to cause them to produce antibiotics in higher concentration.

SUMMARY

It has been attempted to raise the productive capacity of a Streptomyces species of low antibiotic production, by the following means.

(a.) Ultraviolet irradiation.

(b.) Intensification of vitality by frequent passages.

(c.) Refrigeration.

Ultraviolet irradiation increased production by 40 per cent. Treatment with frequent passages produced 50 per cent higher yields. No improvement in production was achieved by refrigeration. On potato blocks spore formation is marked in the refrigerated strains, whereas there is none observable in the irradiated ones, and those frequently passaged.

It has been established that in the interest of raising production the sensitiveness of the species to its metabolic products must be overcome. On the basis of the experiments carried out, it is suggested that this is possible by ultraviolet irradiation, and by intensifying vitality through frequent passages, but not feasible by refrigeration, which increases sensitiveness and thus reduces antibiotic production.

LITERATURE

Duggar, B. M. et al : Ann. N. Y. Acad. Sci. **51**, Art. 2 : 177 (1948).

Dulaney, E. L., Ruger, M. and Hlavac, Ch. : Mycologia (N. Y) **41** ; 388 (1949).

Horváth, J. : MTA IV. Oszt. Közl. **2**, 291, (1953).

Horváth, J.: Akad. ért. **58**. 295. (1951).

Lee, S. B. : Fermentation. Industr. and Eng. Chem. **43** ; 1948 (1951).

McDaniel, L. E., Rahway, N. J. and Hodges, A. B. : Production of Streptomycin-resistant strains of Streptomyces griseus U. S. Pat. Office. **2**, 545, 554 (1951).

Микробиология : Итоги дискуссии по вопросам селекции микроорганизмов. **21**, 257 (1952).

ДАННЫЕ К БИОЛОГИИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИЗМЕНЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВА АНТИБИОТИКИ, ПОЛУЧЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЕМ ОДНОГО ВИДА STREPTOMYCES

Я. Хорват

Резюме

Исследуя антибиотическое действие одного вида происходящего из незнакомой питательной среды, автор установил, что он оказывает антагонистическое действие на большое число грамположительных и грамотрицательных бактерий. Однако, количество произведенного антибиотика было совсем незначительное. Автор в своих исследованиях старался повышать производство действующего вещества. С этой целью он использовал следующие методы : 1. замораживание, как естественный способ исследования действия, 2. повышение жизнеспособности частым пересевом и 3. исследование действия исскуственного солнечного света.

Из результатов исследования видно, 1. что спорообразование замороженного Streptomyces-a в картофельной питательной среде значительно более интенсивно, чем спорообразование микроорганизмов после частого пересева; 2. что замороженный по отношению к организму подвергнутого частому пересеву производит малое количество антибиотика, равняющееся с количеством произведенным перед пересевом; 3. штамм подвергнут частому пересеву производит после 200 дней в среднем на 50% больше антибиотика, чем до эксперимента; 4. спорообразование организмов подвергнутых облучению уменьшается, а антибиотическое действие улучшается на 90% по сравнению с действием до эксперимента; 5. эксперименты, в ходе которых автор применял замораживание и облучение показали, что если после них применить метод частого пересева, то постепенно прекращается действие вызванное замораживанием и облучением и такой штамм после 4—5 месяцев производит приблизительно одинаковое количество антибиотика, как штамм подвергнутый частому пересеву.

Считаясь с результатами этих исследований возникает вопрос, где следует искать причину изменения продукции антибиотика. Во-первых, установлено, что спорообразование у разных видов Sreptomyces-a начинается с тех пор, когда на микроорганизм влияют неблагоприятные действия среды (сдвиг pH, неравномерная дозировка веществ содержащих азот и углерод, дозировка питательной среды, засыхание питательной среды, изменение концентрации соли и т. д.). Микроорганизмы воспринимают эти действия и защищаются от них спорообразованием, чтобы не погибли до восстановления благоприятных условий. В ходе эксперимнтов автор установил, что после замораживания начинается интенсивное спорообразование, а также и то, что в известных питательных средах после облучения нет спорообразования. Вместе с тем с увеличением спорообразования продукция антибиотика уменьшалась. Согласно этому, действие замораживания выражается в увеличении степени чувствительности микроорганизма, которая проявляется и в отношении к собственному антибиотику. Автор установил, что мицелий может производить только определенное количество антибиотика, в зависимости от степени чувствительности. Экспериментально доказано, что замороженный микроорганизм является более чувствительным и что он действительно производил значительно меньшее количество антибиотика, чем микроорганизмы у которых чувствительность уменьшена частым пересевом и облучением.

Подводя итоги своих экспериментов, автор пришел к заключению, что для увеличения продукции антибиотика надо преодолеть чувствительность штамма.

SUR LE PHÉNOMENE D'INTERFÉRENCE ENTRE DIFFÉRENTS VIRUS DE PESTE AVIAIRE DANS L'ŒUF DE POULE EMBRYONNÉ*

Par
L. BODON et M. SZENT-IVÁNYI

Laboratoires »Phylaxia«, Institut de production sérothérapeutique de l'État, Budapest

Reçu le 4 Août 1953

L'effet d'antagonisme qui se manifeste dans la cellule hôte entre deux virus est appelé interférence. Le virus interférant est doué de la faculté de conférer à la cellule dans un bref délai une résistance soit partielle, soit totale contre une infection quelconque par un autre virus. L'organisme hôte peut, par la voie de l'interférence, acquérir la protection dans un délai dont la brièveté ne suffit pas pour la constitution d'une immunité active. L'interférence diffère, en conséquence, manifestement de l'immunité spécifique liée à la production d'anticorps. De nombreuses publications sont parues sur des recherches effectuées depuis l'identification de ce phénomène. C'est ainsi que *Henle* [1], dans son rapport récapitulatif, s'appuie sur un chiffre de travaux qui dépasse de beaucoup la centaine.

En ce qui concerne la littérature hongroise, ce sont *Buzna* et *Hodosy* [2, 3] qui attirèrent l'attention sur le fait, que l'immunité précocement observable et qui est due à la souche du virus de Hertfordshire—appliquée dans notre pays pour la vaccination préventive contre la peste aviaire—est attribuable à l'interférence.

Nous ne savons pas déterminer avec précision le début de l'immunité active inaugurée par le virus de Hertfordshire, car, en dépit du fait que la mise en évidence sérologique n'est praticable qu'à partir du 7e ou 8e jour suivant l'inoculation et que les anticorps humoraux ne sont démontrables à une date bien antérieure ni à l'aide de l'épreuve d'inhibition de l'hémoagglutination [4], ni au moyen de la neutralisation du virus [5], — les animaux sont tout de même protégés contre l'infection à une période notablement antérieure [6]. Dans les expériences explorant l'interférence, c'est l'apparition de l'immunité active se développant graduellement qui gène l'observation de l'interférence. C'est pour cette raison que, en dehors de nos expériences similaires pratiquées sur des poules, nous nous adressâmes également à l'oeuf de poule embryonné où l'observation du phénomene n'était pas génée dans les tissus embryonnaires du fait de l'immunité active. L'embryon du poulet était employé par plusieurs chercheurs aux

*Conférence faite le 9 mai 1953 à la séance scientifique de la Société de Microbiologie de Hongrie.

fins de recherches sur l'interférence dans les cas des virus de la grippe humaine, de l'encéphalite de St-Louis, de l'encéphalo-myélite du cheval (type occidental), de la peste bovine, du typhus exanthématique, des oreillons, de la psittacose et de la méningo-pneumonie [1]. *Bang* [7] avait constaté le phénomène de l'interférence dans l'embryon du poulet entre des souches de Newcastle, d'une part virulentes et d'autre part atténuées grâce aux rayons ultra-violets.

Matériel et méthodes. — En vue d'obvier à l'action perturbatrice qui pourrait éventuellement être déployée par les anticorps spécifiques accumulés dans les oeufs des poules immunisées contre la peste aviaire, nous avons mis à contribution des oeufs de poule embryonnés couvés pendant 10 jours et pondus par des poules réceptives envers la peste aviaire, bien qu'une telle appréhension ne soit pas fondée, selon l'observation de *Schneider* [8], à cette période de l'incubation. Nous nous servîmes, pour les besoins de nos recherches, des virus de peste aviaire désignés par les lettres H et L, de même que du virus de la rue. Le virus H n'est autre que celui de Hertfordshire, L est l'abréviation d'une souche de virus de peste aviaire à virulence pareillement atténuée, manufacturée au laboratoire Lederle et nous appelons virus de la rue un virus virulent de peste aviaire (Newcastle) isolé de l'épizootie de notre pays. Les virus furent inoculés d'après la méthode de *Bodon* et *Csontos* [9] dans la cavité allantoïdienne. La quantité inoculée de chaque virus s'élevait à 0,1 ml d'une dilution à 10^{-3}. Les oeufs contaminés par les virus furent ouverts dans les 48 heures à compter de l'inoculation du virus de la rue, et le liquide allantoïdien, comme le liquide amniotique furent aspirés chacun par une seringue séparée. Les examens ultérieurs furent entrepris avec le matériel, à savoir, la présence du virus fut mise en évidence grâce à l'épreuve d'hémo-agglutination modifiée par *Bamberger* [10], l'dientification du virus fut réalisée en inoculant des poussins qui, comme on sait, contractent la peste aviaire et lui succombent sous l'effet du virus de la rue, tandis que les virus H et L les immunisent sans les rendre malades.

La première série d'expérimentation nous servit en première ligne à l'étude du phénomène d'interférence entre le virus H et celui de la rue. Des lots composés de 5 oeufs embryonnés furent inoculés avec ces virus de la manière suivante : le virus de la rue fut injecté d'abord simultanément avec les deux autres, puis 3, 6, 12, 24, 36 et 48 heures après ceux-ci. Les liquides allantoïdiens et amniotiques aspirés séparément furent tous les deux hémo-agglutinants, les liquides allantoïdiens plus fortement que les amniotiques. Nous réussîmes de la sorte à démontrer la présence du virus de la peste aviaire dans les liquides allantoïdiens, et amniotiques, mais il nous fallut, au surplus, préciser lequel des deux virus introduits s'était multiplié : le H ou celui de la rue. Nous mélangeâmes, à cet effet, séparément les liquides allantoïdiens, de même que les liquides amniotiques des 5 oeufs appartenant à un même lot et inoculâmes avec ces mélanges des poussins sûrement réceptifs

envers la peste aviaire. Les sérums des animaux qui survécurent à l'inoculation furent, à l'expiration de 14 jours, éprouvés quant à la présence de substance inhibitrice à l'hémo-agglutination et leur immunité fut assuré par une infection de vérification.

Dans la deuxième série d'expériences, nous substituâmes le virus L au virus H et intercalâmes encore une avance de 9, 30 et 72 heures, respectivement. Chaque virus examiné fut incorporé à 5 poussins au lieu de 3.

Résultats : la mise en pratique de la première série d'expériences suivant les modalités détaillées plus haut donna les résultats représentés sur la figure 1.

Chaque carré indique 1 poussin. Les carrés hachurés signalent la perte du poussin, autant dire la présence du virus de la rue. Les carrés laissés en blanc signifient l'immunisation du poussin, ce qui veut dire que le virus décelé était du virus H. La partie supérieure de la figure traduit le destin des bêtes vaccinées

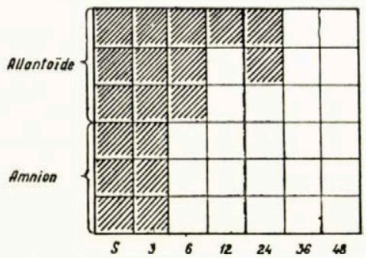


Fig. 1. Interférence entre le virus H et le virus virulent

au liquide allantoïdien, tandis que sa portion inférieure représente celui des poussins inoculés au liquide amniotique. La lettre S signale l'inoculation simultanée du virus H et de celui de la rue ; les chiffres indiquent le nombre des heures écoulées à partir de l'inoculation intra-allantoïdienne du virus H jusqu'à celle du virus de la rue. La figure visualise le fait que les oeufs inoculés simultanément avec les deux virus et ceux inoculés avec une avance de 3 heures au profit du virus H subirent tous la multiplication du virus de la rue, tant pour le liquide allantoïdien que pour le liquide amniotique. En ce qui concerne les oeufs inoculés avec une avance de 6 heures au profit du virus H, nous assistâmes à ce phénomène particulièrement remarquable que le liquide allantoïdien d'un même oeuf hébergait du virus de la rue, tandis qu'on ne vit que du virus H multiplié dans l'amnion de cet oeuf. Quant aux oeufs inoculés au virus de la rue 12, respectivement 24 heures après l'inoculation du virus H, les constatations sont sensiblement analogues, toutefois, sur les 2 groupes de 3 poussins inoculés avec du liquide allantoïdien, il n'y avait qu'un, respectivement deux poussins qui avaient marqué la présence du virus de la rue, en même temps que le comportement de la seconde moitié des animaux d'expérience traduisait la multiplication du virus H. Dans les oeufs contaminés avec des écarts de temps égaux

à 36, respectivement à 48 heures, ce n'est que le virus H qui fut constatable dans le liquide allantoïdien, comme dans l'amniotique, néanmoins, nous ne qualifions de conséquence certaine de l'interférence que le phénomène observé dans les oeufs inoculés avec des avances de 6 et 12 heures au bénéfice du virus H. Nous supposons en effet que le virus de la rue injecté à l'expiration d'un retard de 24 heures après l'inoculation du virus H n'avait pu pousser parceque l'embryon était déjà mort à cette période sous l'action du virus H, en conséquence le tissu vivant nécessaire à la multiplication du virus de la rue n'existait plus. Nous marquâmes cette limite dans la figure par la ligne (—·—·—·).

Le résultat de la deuxième expérience est lisible sur la figure 2, la notation employée pour reproduire les résultats est identique à celle de la figure 1.

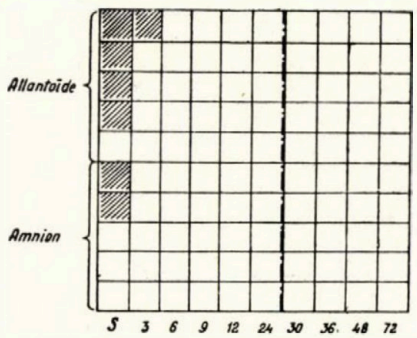


Fig. 2. Interférence entre le virus L et le virus virulent

Cette figure nous enseigne que nous étions à même de mettre en évidence en partie du virus de la rue, en partie du virus L dans les liquides allantoïdiens et amniotiques des oeufs inoculés simultanément. Sur les 5 poussins inoculés au moyen du liquide allantoïdien des oeufs inoculés avec une avance de 3 heures au profit du virus L, un seul a encore succombé, ce qui indique la présence du virus de la rue, mais le virus de la rue n'était plus capable de pénétrer dans le liquide amniotique. Le virus L administré avec une avance de 6 à 24 heures avait assurément interféré avec celui de la rue. Étant donné que le virus L ne tue l'embryon qu'au bout de 30 à 36 heures, il est incontestable dans cette expérience que le virus de la rue aurait bien possédé la faculté de se multiplier au niveau du tissu vivant, à moins que le virus L ne l'en eût empéché.

Le virus que l'on avait fait parvenir dans le liquide allantoïdien ne saurait être véhiculé dans la cavité de l'amnion et n'est constatable dans le liquide amniotique que dans le cas où, pendant sa multiplication, il se propage à travers les parois à plusieurs couches de cellules étroitement juxtaposées l'une sur l'autre, de l'allantoïde et de l'amnion. Ceci équivaut à dire que le virus pénètre dans l'embryon soit par l'entremise des cellules de la paroi allantoïdienne en-

trant dans le corps embryonnaire, soit en se propageant jusque dans les vaisseaux et en se multipliant dans le corps embryonnaire ; l'aboutissement en sera sa pénétration dans le liquide amniotique. Au cas où le virus interférant bloque les couches de cellules sus-mentionnées, le virus supplanté ne sera capable de se propager jusqu'au liquide amniotique ni par l'une, ni par l'autre des voies spécifiées plus haut. En acceptant n'importe laquelle des théories explicatives de l'interférence, on pourra imaginer que le phénomène d'interférence doit se produire conformément à notre conception et que les conséquences de ces phénomènes doivent se manifester par la différence qualitative de la teneur respective

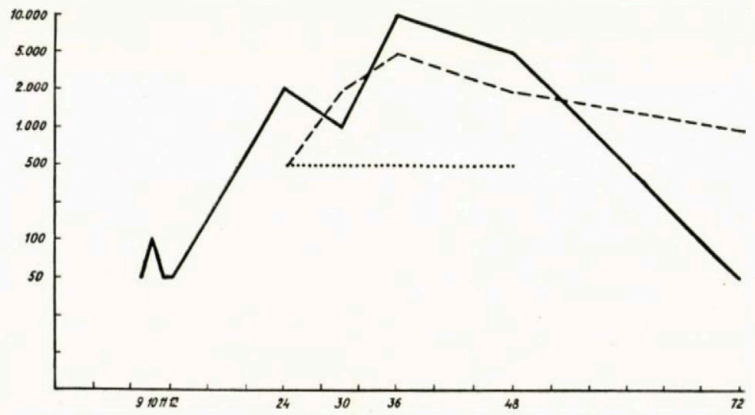


Fig. 3. La teneur en virus du liquide allantoïdien mise en évidence à l'aide de l'épreuve d'hémo-agglutination

en virus du liquide allantoïdien et amniotique. Nos résultats confirment la justesse de notre conception.

Aux fins d'expliquer le fait pourquoi les virus H et L sont capables de déployer de l'interférence à l'encontre du virus de la rue et pourquoi ce phénomène se réalise dans un délai considérablement plus court pour le virus L que pour le virus H, nous allons faire connaître en synopsis les résultats des examens récapitulés dans les figures 3 et 4 qui avaient déjà en partie été publiés [11] par l'un de nous *(Bodon)*, examens institués au sujet de la vitesse de multiplication à l'intérieur de l'oeuf embryonné des 3 virus employés dans notre expérimentation.

Afin d'effectuer la contamination des oeufs nous avons utilisé 0,1 ml de chaque virus étendus à 10^{-3}. La contamination fut réalisée par inoculation dans le liquide allantoïdien, les oeufs furent placés ensuite dans une étuve à 38° C. A l'expiration de ½, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24, 30, 36, 48 et 72 heures après l'infection, 5 oeufs furent chaque fois extraits de l'étuve et,

dans chacun de ceux-ci, le liquide allantoïdien et le liquide amniotique furent récoltés isolément. Pour ces prélèvements, nous nous sommes servis de seringues séparées pour chaque oeuf et pour chaque liquide. La matière recueillie fut mise dans un réfrigérateur à la température de —10° C. La présence des virus fut mise en évidence moyennant l'épreuve de l'hémo-agglutination.

Nous avons obtenu les renseignements suivants : la substance hémo-agglutinante fut démontrable dès la 9e heure dans le liquide allantoïdien d'oeufs contaminés avec du virus L inoculé dans la cavité allantoïdienne (figure 3), elle ne devint, par contre, décelable dans le liquide amniotique qu'à partir de la 24ième heure après l'infection (figure 4).

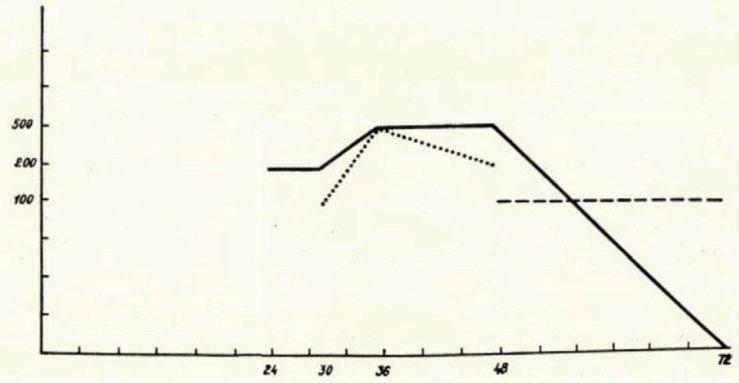


Fig. 4. La teneur en virus du liquide amniotique mise en évidence à l'aide de l'épreuve d'hémo-agglutination

Sont figurés sur l'ordonné les titres d'hémo-agglutination, tandis que l'abscisse indique le nombre des heures écoulées depuis l'injection dans la cavité allantoïdienne. Le trait plein représente le virus L, le trait pointillé (. . . . .) le virus H, enfin les traits interrompus (— — — —) indiquent le virus de la rue

A partir du liquide allantoïdien d'oeufs inoculés dans l'allantoïde avec du virus H, la substance hémo-agglutinante peut être mise en évidence à compter de la 24e heure (figure 3), à partir du liquide amniotique des mêmes oeufs, cette démonstration devint possible depuis la 30e heure (figure 4).

En présence du virus de la rue, la substance hémo-agglutinante apparaît dans le liquide allantoïdien également dès la 24e heure (figure 3), elle n'apparaît dans le liquide amniotique que dès la 48e heure (figure 4), même dans l'éventualité où l'embryon avait péri dans l'intervalle.

La possibilité du développement de l'interférence est probablement subordonnée aux différences entre les vitesses de multiplication des virus H, L et de la rue, le caractère d'interférence plus énergique inhérent au virus L reconnaît vraisemblablement la même cause.

RÉSUMÉ

Les auteurs mirent à l'étude l'effet d'interférence qui se manifeste de la part des souches virales à virulence atténuée H (Hertfordshire) et L (Lederle) vis-à-vis du virus de la rue (virus virulent de peste aviaire — Newcastle — isolé à partir d'une épizootie de Hongrie).

L'inoculation des virus étudiés (H et virus de la rue, respectivement L et virus de la rue) s'était invariablement opérée dans la cavité allantoïdienne, d'abord simultanément, puis l'inoculation du virus de la rue fut pratiqué à des périodes postérieures à l'injection des virus H et L, périodes reproduites et lisibles sur les figures 1 et 2. L'apparition du virus était vérifiée 48 heures après l'inoculation du virus de la rue, la vérification s'effectuait grâce à la mise en évidence de l'apparition de la substance hémo-agglutinante dans le liquide amniotique. L'identification du virus apparu fût pratiquée par l'intermédiaire de l'inoculation de poussins, qui succombent à la peste aviaire sous l'action du virus de la rue, tandis que les virus H et L les immunisent sans leur transmettre la maladie.

Lorsque le virus H est incorporé dans la cavité allantoïdienne 6 heures avant l'inoculation du virus de la rue, il mettra obstacle à la propagation du virus de la rue dans le liquide amniotique (figure 1), le même effet sera obtenu grâce au virus L, mais une antériorité de 3 heures est suffisante pour ce dernier (figure 2).

Il ressort des figures 3 et 4 d'abord que l'origine de l'effet confirmé d'interférence que les virus H et L manifestent dans l'oeuf embryonné vis-à-vis du virus de la rue est imputable à la différence des vitesses de multiplication que les virus étudiés présentent dans l'oeuf de poule embryonné, ensuite que la faculté d'interférence plus énergique déployée par le virus L est attribuable à la même cause.

LITTÉRATURE

1. *Henle, W. J.:* J. Immunol. **64** (1950) 203—236.
2. *Buzna, D., Hodosy J.:* M. Állatorvosok L. **5.** (1950) 135—137
3. *Buzna D., Hodosy J.:* M. Állatorvosok L. **6.** (1951). 133—137.
4. *Bodon L., Rojti M., Szent-Iványi M.:* Acta Vet. Hung. **2.** (1952) 343—353.
5. *Doll E. R., Wallace M. E., McCollum W. H.:* Am. J. Vet. Res. **11.** (1950) 265—271.
6. *Bamberger, K.:* M. Állatorvosok L. **5** (1950) 225—233.
7. *Bang, F. B.:* J. Exper. Med. **89** (1949) 141—154.
8. *Schneider L.:* Acta Vet. Hung. **1.** (1951) 251—259.
9. *Bodon L., Csontos L.:* M. Állatorvosok L. **6.** (1951) 263—265.
10. *Bamberger K.:* M. Állatorvosok L. **3.** (1948) 362—367.
11. *Bodon L.:* Acta Vet. Hung. **3.** (1953) 55—62.

ЯВЛЕНИЕ ИНТЕРФЕРЕНЦИИ МЕЖДУ РАЗНЫМИ ШТАММАМИ ВИРУСА ЧУМЫ ПТИЦ В ОПЛОДОТВОРЕННОМ КУРИНОМ ЯЙЦЕ

Л. Бодон и М. Сент-Иваньи

Резюме

Авторами изучался интерферирующий эффект сниженной вирулентности вирусных штаммов Х (Хертфордшайр) и Л (Ледерле) против вирулентного уличного отечественного штамма (Newcastle), изолированного при эпизотии. Употреблялись яйца, у которых с уверенностью можно было исключить появление активного иммунитета, мешающего наблюдению явления интерференции.

Изучаемые вируса (Х и уличный, resp. Л и уличный) вводились в аллантоидную полость, одновременно. Затем в показанное в таблицах 1 и 2 время после введения вируса Х или Л вводился уличный вирус. Момент появления вируса после двух суток от введения уличного вируса в амнионной жидкости определялся выявлением появления гемагглютинирующего вещества. Идентификация появившегося вируса производилась прививкой его на куриный молодняк, который при наличии уличного штамма погибал от чумы птиц, при наличии же штаммов Х или Л не заболел, а иммунизировался. Резуль-

тат показан в рисунке 1 и 2, где каждый квадрат соответствует одному цыпленку. Заштрихованный квадрат представляет падеж цыпленка, т. е. свидетельствует о наличии уличного штамма. Незаштрихованный квадрат представляет выжившего цыпленка, указывает на выработку иммунитета — на наличие штаммов X или Л.

В верхней части рисунка представлена судьба куриного молодняка, который прививался аллантоидной, в нижней же, привитого амниональной жидкостями. Буквой »S« обозначено симультанное введение X. resp. Л. штаммов с уличным, цифры же показывают момент (в часах) введения уличного штамма в аллантоидную полость после прививки штаммом X. resp. Л.

Таким образом авторы доказали, что штамм X при введении его на 6 часов раньше уличного штамма в аллантоидную полость, воспрепятствует размножению последнего в амнионной жидкости. (Рис. 1.) Подобный эффект получается с штаммом Л, при введении его на 3 часа раньше уличного штамма. (Рис. 2.)

На рис. 3 и 4 показано, что в основе интерферирующего эффекта штаммов X и Л в отношении уличного штамма лежит быстрое размножение первых в оплодотворенном курином яйце. Этимже объясняется более сильный интерферирующий эффект штамма Л.

АНТАГОНИЗМ ИНДИВИДУУМОВ БЛИЗКИХ ДРУГ К ДРУГУ ВИДОВ, ПРИНАДЛЕЖАЩИХ К ОДНОМУ РОДУ В МИКРОБИОЛОГИИ*

II. СООБЩЕНИЕ.

А. И. ГАВАШ

при участии Б. Шернь, М. Кубини, И. Фюрес, И. Сабо, И. Холлош и Н. Зольтаи.

Поступило 10. авг. 1953. г.

Акад. Т. Д. Лысенко в последние годы в некоторых своих трудах, стоящих на основе мичуринской биологии, продолжающих и усовершенствовавших последнюю, строго применяя методы развитого в новые высоты Сталиным диалектического материализма, пересмотрел учение дарвинизма. Он же установил историческое значение дарвинизма, состоящее в том, что это учение низвергло старую, метафизическую и идеалистическую биологию, рассматривающую видовые формы как вечные и неизменные и вместо ее, совместно с Ламарком, Дарвин ставил учение эволюционизма. Виды у Дарвина уже не возникают независимо друг от друга, а один вид происходит из другого вида и все они изменимы. Этим Дарвин создал основы материалистической, действительно научной биологии.

Вместе с тем Лысенко указал и на ошибки Дарвина, которые состояли прежде всего в отрицании границ между отдельными видами и наконец привели к отрицанию действительного существования видов. Вид, по этим взглядам, является только каким-то выдуманным понятием, созданным естествоиспытателями в основном только для удобства систематики. Лысенко в своих трудах, имеющих огромное значение, строго критикует и плоский дарвинизм и ставит на его место мичуринский творческий дарвинизм, устанавливая исключительное значение вида и определяя единственно правильное, диалектическо-материалистическое понятие вида.

Труды Т. Д. Лысенко имеют особое значение для сельскохозяйственной ботаники, хотя сам Лысенко высказал мнение, что они действительны также для зоологии и для микроорганизмов.

Не может быть задачей данной работы подробно заниматься этими вопросами.

Предметом трудов Т. Д. Лысенко являются вопросы вида и видообразования, и на основании этих вопросов он вводит новое в науку о биологическом виде. Мы занимались в связи с вопросом о виде такой м и к р о-

* Доложено на заседании V. медицинского отдела Акад. Наук Венгрии от 8-го дек. 1952 г. Частично доложено на I. съезде Общества Венгерских микробиологов 6—12 янв. 1952 г.

биологической проблемой, которая основывается на определении вида по Лысенко. Мы исходили из одной установки Лысенко и старались вести свою работу соответствуя этой установке, исследовали, в какой мере данная установка доказываема дальше, удается ли делать нам из результатов наших исследований более подробные заключения.

Лысенко в своем докладе на научной сессии ВАСХНИЛ в 1948 г., и после этого в нескольких трудах занимался новым определением вида. Кажется правильным воспроизвести здесь несколько формулировок вида:

»Вид — это особенное качественно определенное состояние живых форм материи. Существенной характерной чертой видов растений, животных и микроорганизмов являются определенные внутривидовые взаимоотношения между индивидуумами. Эти внутривидовые взаимоотношения качественно отличны от взаимоотношений между индивидуумами разных видов. Поэтому качественное отличие внутривидовых взаимоотношений от межвидовых взаимоотношений является одним из важнейших критериев для различения видовых форм от разновидностей.«*

Это определение, которое рассматривается нами как основной закон в органической природе, имеет особое значение также и для микробиолога. Как раз в микробиологии имеются многочисленные разногласия относительно разделения микробов по видам и казалось необходимым введение термина »условных видов«, чтобы временно ввести сюда или отделять тот или другой микробный штамм, пока с ними ближе ознакомятся и создается объективная основа для их размежевания. Приведенный выше цитат как раз исключает возможность и »условных видов«.

Следующее положение тоже дает определение вида: »Виды — это звенья цепи живой природы, это этапы качественной обособленности, ступеньки постепенного исторического развития органического мира«.**

Этим определением подчеркивается рассматривание вида, как биологической основы. Но оно содержит также факт, что в то время, когда природа разделяется на виды, происходит дальнейшее и постоянное развитие природы, и существующие уже раньше виды не только воспроизводят сами себя, но могут создать и создают другие, также новые виды.

Наконец третье, для нас особо важное, служившее исходным пунктом положение развивается из первого:

»Легко подметить, что взаимоотношение индивидуумов разных видов одного и того же ботанического или зоологического рода не только не содействует процветанию данных видов, а наоборот, они конкурентны, анта-

* Т. Д. Лысенко: Новое в науке о биологическом виде М. 1951. стр. 8.
** Там же стр. 10.

гонистичны. Поэтому в естественной природе и в сельскохозяйственной практике обычно трудно найти примеры длительного сосуществования в смесях (популяциях) индивидуумов разных, но близких видов, т. е. одного и того же ботанического рода. Совместное существование растительных видов часто наблюдается, но это виды — далекие друг другу, принадлежащие к разным ботаническим родам.«*

Этот третий тезис занимал нас больше всего. Хотя у Лысенько подчеркнуты в основном только ботанические отношения данного тезиса, все же, ввиду его связи с определениями вида стало очевидным, что этот тезис имеет общий характер и относится также к микробиологии. Нам казалось, что если удастся доказать правильность тезиса и для микробиологии — мы получим удобный метод для изучения взаимной связи микроорганизмов, их принадлежности к определенному роду и виду, а даже кроме теоретических размышлений мы доберемся до его важного практического значения. Обдумывая вышесказанное, мы составили план следующих опытов и проводили их.

Для первой серии опытов мы выбрали два штамма Salmonellae: S. typhosa и S. paratyphi B. (Schottmüller), свойства которых в бактериологическом отделении Гос. Ин-та Здравоохранения были хорошо известны относительно антигенной структуры, расщепления сахаров и вирулентности. Из каждого штамма была изготовлена взвесь (1 см³ содержал около 750 млн бактерийных тел). После этого одинаковое количество каждой взвеси было смешано, из смеси прививали по две пробирки с дрожжевым бульоном и с агаром. После 48 часового пребывания в термостате, делали пересев из бульона на такую же питательную среду, что и повторялось промежутками в 48 часов всего десять раз. Из последней пробирки делали высев на чашку Петри с питательной средой Wilson-Blair'a (бисмутсульфит-бриллянтгрюн), спустя 24 и 48 часов осматривали выращенные колонии макроскопически и определили расщепление сахаров, антигенную структуру и вирулентность. На основе всего этого мы могли установить, что на 22. день опыта на чашке Петри выросли только однородные, амебоидные колонии, характерные для паратифа B, а колоний типа S. typhosa — не оказались. Антигенная структура колоний соответствовала паратифу B, только казалось, что аспецифический антиген H начинает исчезать. Расщепление сахаров указало полностью на обычную картину паратифа B; вирулентность дала характер паратифа B, хотя одно из опытных животных (белая мышь) осталось в живых.

Как видно из этих данных, наш опыт, повторенный и неоднократно по ходу контролированный, в данном случае доказал действенность тезиса Т. Д. Лысенко для выбранных нами двух штаммов Salmonellae. Необ-

*»Правда« от 3. XI. 1950 г.

ходимо отметить, что Лысенко подчеркнуто говорит о невозможности длительного совместного проживания индивидуумов близких друг к другу видов, принадлежащих к одному и тому же роду. Поэтому нельзя ожидать, чтобы из первой смеси бактерий немедленно вырос только один вид. Мы считаем, что десятикратный пересев для употребляемых нами штаммов Salmonellae совершенно достаточен для того, чтобы один штамм исчез, а другой остался. Мы не можем подтвердить, что столько же время достаточно и может служить правилом для любого подобного опыта, наоборот, мы считаем, что решение этого вопроса остается для будущего.

Данным опытом также доказано, что избранные два штамма Salmonellae, typhosa и paratyphi B, являются двумя самостоятельными видами, которые близко стоят друг к другу и принадлежат к одному и тому же роду, Salmonella. Нам же известно из трудов Лысенко, что внутривидового антагонизма нет и не может быть. Это доказано Красильниковым для микроорганизмов своими многочисленными опытами над актиномицетами. С другой стороны по изданию 1948 г. книги Берджи (Bergey) имеется сомнение, являются ли перечисленные там примерно 150 штаммов Salmonellae самостоятельными видами или нет, поэтому они названы там антигенными типами. По указанным выше теперь уже ясно, что хотя бы определенная часть их действительно самостоятельный вид — ясно в дальнейшем, что возбудитель брюшного тифа не принадлежит к одному отдельному роду, Eberthella, как об этом в литературе все еще часто упоминается, а вид, принадлежащий к роду Salmonella. Мы указывали в своем предварительном сообщении*, относящемся к данному вопросу, что штамм paty. B сам изменился вследствие совместного роста, вследствие измененной от обмена веществ исчезнувших индивидуумов S-typhosae питательной среды, или же вследствие другой, не вскрытой еще причины преобразовался в новый вид свойствами, в известной мере отличающимися от свойств оригинального штамма paty B (некоторые отклонения в антигенной структуре, ослабленная вирулентность). Впоследствии мы производили в большом количестве подобные опыты с близко стоящими друг к другу видами других родов, но нам не удалось с полной уверенностью доказать, что оставшиеся к концу опыта индивидуумы определенного вида изменили бы свои свойства в такой мере, чтобы говорить об образовании нового вида. Отдельные колонии могут дать некоторые колебания, но определение достаточного количества колоний убеждает нас, что эти изменения не постоянны. Поэтому мы пока считаем преждевременным говорить об образовании нового вида.

В следующей серии опытов мы занимались другими штаммами Salmonellae, при чем пользовались той же методикой, как и в предыдущей

* Hepegesшегюдь 1951., № 4 (на венг. яз.)

серии. Эти штаммы были: S. typhosa, S. paty B Schottmüller, S. typhimurium Breslau, S. paty C Hirszfeld и S. enteritidis Gaertner. Опыты производились в 15 комбинациях попарно до десяти пассажей. В этих опытах бросалось прежде всего в глаза, что в то время как штамм S. paty C после совместного культивирования с S. typhosa, paty A, typhi murium и enteritidis исчез, рядом с S. paty B — остался. Вообще штамм S. paty B дал в этих опытах иной результат, чем в первой серии опытов. Рядом с ним после десяти пассажей остались штаммы S. typhosa, paty A и typhi murium, а исчез только S. enteritidis. Остальные вариации не дали однозначные результаты, поэтому необходимо в дальнейшем заниматься ими повторно.

Значительно более интересный и однородный результат был получен из опыта, где из взвеси всех упомянутых штаммов была изготовлена смесь в одинаковом количестве, потом из этой смеси был сделан посев на одну пробирку с бульоном (из лошадиного мяса). После десятого пассажа исчез только штамм paty C, а колонии остальных пяти штаммов появились на чашке Петри (с бисмут-сульфитом). Опять же на основе указания Т. Д. Лысенко, что индивидуумы близко стоящих друг к другу видов не в состоянии к длительному сожительству, было решено — в отличии от прежних опытов — продолжать опыты с пассажами. Так дошли мы до 25. пассажа, когда делали высев на чашку Петри. Теперь можно было установить, что четыре штамма исчезли из совместного культивирования, а остались только два штамма, S. paty B. Schottmüller и typhi murium. Таким образом была доказана правильность результата нашего первого опыта, по которому рядом с штаммом paty B. штамм typhosa длительно не может существовать.

Причиной явления оставания рядом друг с другом штаммов Schottmüller и Breslau можно принимать предположение, что здесь речь идет не о двух самостоятельных видах, а только о двух разновидностях. На это указывают данные книги Берджи (изд. 1948 г.), где оба штамма находятся в группе B, под № 2 и 4. Их соматические (0) антигенные группы тождественны. А как было упомянуто выше — по Т. Д. Лысенко разновидности одного вида могут существовать вместе. Опыты Н. А. Красильникова с актиномицетами доказали то же самое. Поэтому после 25 пассажей остался только один вид, а остальные четыре штамма (вида) исчезли.

На основе полученных в наших опытах данных пока еще мы не можем составить определенный ряд штаммов Salmonellae, но уже можно установить, что впереди всех стоят S. paty B. Schottmüller и typhi murium Breslau, как разновидности одного вида, а в конце — paty C. Hirszfeld, который — за исключением одного опыта — исчез из всех опытов совместного культивирования. Можно еще предположить принадлежность S. typhosa и enteritidis Gaertner к одному виду, как разновидности. На это указывает также их тождественная группа антигенов.

Данная серия опытов со своей стороны также доказывает действительность положения Т. Д. Лысенко в микробиологии, точнее в исследованной части ее. Разные виды Salmonellae оказались антагонистами друг к другу и в этой серии опытов.

Под антагонизмом вообще и в микробиологии в частности понимается не всегда то же самое. Действие антибиотиков разъясняется »антагонизмом« разных микроорганизмов друг к другу. Разные авторы описывали антагонизм филогенетически далеко стоящих друг от друга видов микробов. Определенная роль приписывается »антагонизму« также в направленной изменчивости микроорганизмов. Мы понимаем под этим термином другое: биологическое явление, свойство, которое имеется налицо постоянно при естественных условиях, которое поэтому не передается искусственно, при неестественных условиях определенным микроорганизмом. Из многочисленных примеров литературы кажется достаточно упомянуть »индуцированный бактериальный антагонизм« Севедж' а и Флоури (Savage a. Florey), где, как на это указывает само название, антагонизм не был естественным свойством бактериального штамма, а был введен извне — »индуцирован«. В наших опытах индивидуумы одного вида находятся в непримиримом антагонизме с индивидуумами другого вида. Это видно также и из данных опытов, сообщенных Т. Д. Лысенко. Упомянутые им растительные индивидуумы, члены видов, принадлежащих к одному и тому же роду, находятся в такой же конкуренции, антагонизме, и их продолжительное совместное сожительство невозможно потому, что одни подавляются другими. Эти индивидуумы, по мнению Т. Д. Лысенко, физиологически несовместимы.

Кроме описанных нами опытов мы проводили опыты также и с Shigellae в более широком масштабе, чем с видами Salmonellae, причем число комбинаций было больше. Мы взяли известные у нас четыре штамма: Sonne, Flexner, Schmitz и Shiga, иногда из одного и того же штамма с разными распознавательными знаками, рассчитывая на то, что таким путем наши опыты становятся более надежными, контролируемыми. I. таблица содержит данные по характеристике расщепления сахаров и агглютинации четырех основных штаммов. Таблица содержит далее данные после совместного выращивания. Как видно, значительные изменения в расщеплении сахаров и в агглютинации не появились.

С штаммами Shigellae были проделаны те же опыты, как и с шт. Salmonellae только с той разницей, что пересев был произведен после каждых 24 часов т. е. выбранные штаммы выращивались на той же самой жидкой питательной среде в течение 24 часов, после чего гомогенизировались встряхиванием, приготовились по возможности одинаковые взвеси из каждой культуры; из двух взяли одинаковые количество и их смесь перевели в одну пробирку с жидкой питательной средой, которую ставили в термо-

Таблица I

Расщепление сахаров и агглютинация штаммов

	656. Sonne		665. Flexner »б«		592. Schmitz		153. Shiga	
	до	после	до	после	до	после	до	после
	пассажа		пассажа		пассажа		пассажа	
сахароза	1 сл. ± после 18, дней	О после 15-20 дн.	0	0	0	0	0	0
лактоза	+ после 4—9 дн.	0	0	0	0	0	0	0
ксилоза	0	0	0	0	0	0	0	0
рамноза	+ после 24 часов	+	О после 19 дн.	+ после 21 дня	+	+	0	0
дульцит	0	0	0	0	0	0	0	0
декстроза	+	+	+	+	+	+	+	+
галактоза	+	+	+	+	+ после 24 ч.	+ после 24 ч.	+ после 24 ч.	+ после 24 ч.
маннит	+	+	+	+	0	0	0	0
арабиноза	+	+	+ пос. 24 ч.	+ пос. 24 ч.	0	0	+ 21 д.	+ 21 дн.
мальтоза	+	+	+ 20 дн.	+ 5 дн.	+ 4—12 дней	+ 12—15 дней	+ 15 дн.	+ 14—15 дн.

Агглютинация.

Сывор. Sonne	R.	1 : 800	1 : 800					
	S.	1 : 100	1 : 100					
« Flexner				1 : 6400	1 : 6400			
« Schmitz						1 : 200	1 : 200	
« Shiga								1 : 800 1 : 800

стат на 24 часа. После такого срока следовала гомогенизация, пересев и так дальше до десятого пассажа, из которого же делали высев на чашку Петри, выросшие на которой колонии исследовались макроскопически, определились расщепление сахаров и агглютинация для определения отдельных колоний.

С штаммами Shigellae раньше проводили опыты попарно в разных вариациях, потом делали посев из трех штаммов на одну пробирку и наконец соединили все четыре штамма в один опыт. Естественно, что один и тот же опыт был повторен неоднократно, и брали для контроля различные культуры того же штамма. Результаты наших опытов в разных комбинациях видны из таблицы II. и III.

Из этих опытов можно сделать такой вывод, что после десяти пассажей как правило вырос только один штамм, а другой штамм, т. е. другие два или три штамма — исчезли. Относительно тех редких случаев, где после десяти пассажей выросли все же два штамма, надо указать на тот факт, что колонии этого второго, неожиданно выросшего штамма, были в значительно меньшем количестве, иногда их можно было найти после долгого искания в одиночных числах. Ясно поэтому, что этот второй штамм находился на пути исчезновения и подавляется постепенно другим штаммом. Кроме того необходимо здесь повторить указание Т. Д. Лысенко о том, что индивидуумы двух, принадлежащих к одному и тому же роду видов д л и т е л ь н о не могут совместно существовать и одни задавят другие после определенного времени. Поэтому в этих редких случаях опыты из десяти пассажей не оказались еще достаточными и необходимо было бы продолжать посевы до тех пор, пока появится только один вид. Только один единственный опыт кажется нам необъяснимым, а именно совместное выращивание штаммов Sonne, Shiga и Flexner, где неожиданно остался не штамм Sonne, а штамм Flexner. Подобного случая мы не встречали, хотя нами были проведены многочисленные опыты. Все же мы должны думать о следующем обстоятельстве: представителем штамма Sonne мы выбрали для данного опыта не привычный лабораторный № 1235, а шт. 1235 Sonne I., где »I« означает, что данный штамм был получен как остаток десяти пассажей из предварительного опыта совместного выращивания штаммов Sonne, и Flexner. Допустим, что в этом штамме »I«, хотя и обыкновенно наши методы для определения характеристики не показали никакого отклонения от исходного штамма, во время первого опыта начались такие скрытные изменения, которые во втором опыте развивались и индивидуумы первоначального штамма Sonne получили характер штамма Flexner. К сожалению, п р я м ы х д о к а з а т е л ь с т в к этому предположению у нас нет.

О п и с а н н ы е з д е с ь о п ы т ы — несмотря на единичные, но несомненно объяснимые отклонения — с о с в о е й с т о р о н ы (и в б о л ь ш е м к о л и ч е с т в е, ч е м п р е д ы д у щ и е о п ы т ы, п о-

Таблица II

По-парное совместное выращивание штаммов Shigellae

Шт.	Sh'gellae	Совместно с штаммом Shigellae	После десяти пассажей вырос штамм
656	Sonne	665 Flexner	Sonne
656	Sonne	153 Shiga	Sonne
766	Sonne »g«	665 Flexner	Sonne
766	Sonne »g«	153 Shiga »t«	Sonne
766	Sonne »g«	153 Shiga »g«	Sonne
766	Sonne »g«	592 Schmitz	Sonne
766	Sonne »2«	153 Shiga »t«	Sonne
766	Sonne »2«	153 Shiga »g«	Sonne
766	Sonne »2«	592 Schmitz	Sonne
1185	Sonne	1171 Flexner	Sonne
656	Sonne II.	153 Shiga	Sonne
	Sonne »b« Bakt. S	665 Flexner	Sonne и Flexner
665	Flexner	153 Shiga »t«	Flexner
665	Flexner	592 Schmitz	Flexner
592	Schmitz	153 Shiga »t«	Schmitz
152	Schmitz	153 Shiga »g«	Schmitz и Shiga
592	Schmitz	153 Shiga »t«	Schmitz и Shiga
592	Schmitz	153 Shiga »t«	Schmitz

этому они имеют больше доказательной силы) подтверждают действительность положения Т. Д. Лысенко в микробиологии, также при исследовании другого микробного рода, а не только рода *Salmonellae*. Уже по ходу опытов со штаммами Salmonellae оказались явления, которые как будто подавали возможность делать дальнейшие выводы. Ввиду того,

Таблица III

Совместное выращивание штаммов Shigellae (по-три и по-четыре)

Исходные штаммы				Оставшиеся после десяти пассажей штаммы
1235	Sonne	1314 Flexner	592 Schmitz	Sonne
1235	Sonne	153 Shiga	592 Schmitz	Sonne
1235	Sonne I.	153 Shiga	1314 Flexner	Flexner
1235	Sonne I.	153 Shiga	592 Schmitz	Sonne
1314	Flexner	153 Shiga	592 Schmitz	Flexner и Schmitz
1314	Flexner	153 Shiga	592 Schmitz	Flexner и Schmitz
1235	Sonne	1314 Flexner	153 Shiga 592 Schmitz	Sonne
1235	Sonne	1314 Flexner	153 Shiga 592 Schmitz	Sonne

что сделанные там наблюдения по нашему мнению и здесь полностью доказаны, мы считаем целесообразным подытожить эти выводы. Наряду с тем фактом, что при совместном выращивании— когда оно продолжалось достаточно длительное время и с достаточным количеством пересевов, — к концу опыта, оставался всегда только один штамм, нельзя не заметить, что оставался не какой-нибудь штамм, а при вариации штаммов один определенный штамм оставался всегда, второй штамм оставался только при известных вариациях, для третьего имелась еще меньшая возможность для оставания, а четвертый никогда не оставался к концу опыта. То есть штаммы Shigellae — но и Salmonellae — не просто антагонистичны друг к другу. Внутри одного и того рода виды не имеют одинакового значения, а они образуют ряд, составляемый и оценимый на основании степени их антагонизма к другим видам того же рода. Наши таблицы показывают, что штамм Sonne сохранял в любой комбинации совместного культивирования жизнеспособность к концу опыта. Поэтому из четырех штаммов опыта надо считать главным штамм Sonne. После него следует штамм Flexner потому, что после совместного культивирования с штаммами Schmitz и Shiga, к концу опыта Flexner как правило вырастает на чашке Петри. Штамм Schmitz остается выращиваемым только в комбинации со штаммом Shiga, поэтому занимает лишь третье место, а последний — Shiga — исчезает из всех опытов совместного

культивирования и таким образом является четвертым и последним членом ряда. Такой ряд получается также из опытов, где совместно культивируется три или четыре штамма. Все четыре штамма этих опытов должны рассматриваться как четыре самостоятельных вида и вместе взятые принадлежат к одному и тому же роду. Причина данного факта нам конечно не ясна, и решение вопроса вряд ли будет легкое. С другой стороны несомненно, что решение этого вопроса дало бы данные большого значения для научной биологии.

Хочется здесь указать на такой эпидемиологический факт. Штамм Shiga являлся первым, выращенным из испражнений дизентерийного больного, поэтому и получил первоначальное название bacillus dysenteriae. Позже, при ознакомлении с другими дизентерийными штаммами, штамм Shiga еще в довольно большом проценте оказался возбудителем дизентерии. В последних годах она обнаруживается все реже, и в наши дни его определение возбудителем можно считать редкостью. Его роль перенимали штаммы Sonne и Flexner. Можно полагать, что причина такого явления скрывается в антагонизме близких друг другу видов (правильнее их индивидуумов) одного и того же рода.*

Нами были проделаны несколько опытов, чтобы доказать, что индивидуумы отдаленных видов, принадлежащих к чужим родам, могут жить и размножаться без всяких препятствий. Эти опыты документируются отдельной IV. таблицей.

Эта таблица, особенно что касается совместного выращивания Salmonellae и Shigellae, кажется, в достаточной мере демонстративна и доказательна. Невозможно объяснять, поэтому необходимо считать экспериментальной ошибкой единственный случай, где S. paty B в совместном культивировании с штаммом Sh. Shiga к концу опыта остался одиночным. Тем более необъяснимым является этот единичный случай потому, что при повторении опыта (таблица не содержит данных этого повторного опыта), индивидуумы обоих штаммов остались к концу опыта.

* Во время окончательной обработки данной статьи я ознакомился с статьей В. Л. Троицкого (ЖМЭИ, 1953 г., № 3) о классификации возбудителей дизентерии. Я согласен с целым рядом положений В. Л. Троицкого, особенно относительно требований мичуринской микробиологии. Можно спорить о том, правильнее ли называть род возбудителей дизентерии »Shigellae«, или же »B. dysenteriae«, но надо сказать, что название »B. dysenteriae«, как рода сегодня звучит несколько странно, ибо как правило мы, первым словом указываем на род, а вторым — на вид, а под »Bacillus« мы подразумеваем определенный род, куда возбудители дизентерии совсем не входят. В такой форме прибавка напр. »Sonne« означала бы разновидность. Относительно последовательности четырех бактерийных видов, имевших у нас в эксперименте и признанных Троицким основными возбудителями дизентерии, я вынужден настаивать на собственном составлении : Sonne, Flexner, (Штуцер-), Schmitz и (Григорьев-) Shiga, ввиду того, что я такую последовательность определил на основании свойства антагонизма между индивидуумами близко стоящих друг к другу видов одного и того же рода, выдвинутого Т. Д. Лысенко. И каждый означает самостоятельный вид. А. Г.

Таблица IV

Совместное выращивание индивидуумов штаммов, принадлежащих к разным родам

Первый штамм	Второй штамм	Остался после десяти пассажей
»Куб« S. typhosa	655. Sh. Flexner	Typhosa и Flexner
»Куб« S. typhosa	153. Sh. Shiga »t«	Typhosa и Shiga
»Куб« S. typhosa	766. Sh. Sonne »g«	Sonne
»Куб« S. typhosa	766. Sh. Sonne »2«	Sonne
»Куб« S. typhosa	592. Sh. Schmitz	Typhosa и Schmitz
»Куб« S. Paty B	665. Sh. Flexner	Paty B и Flexner
»Куб« S. Paty B	153. Sh. Shiga »t«	Paty B
»Куб. S. Paty B	766. Sh. Sonne »g«	Paty B и Sonne
»Куб« S. Paty B	766. Sh. Sonne »2«	Paty B и Sonne
»Куб« S. Paty B	592. Sh. Schmitz	Paty B и Schmitz
»Куб« S. Paty B	656. Sh. Sonne	Paty B и Sonne
»Куб« S. Paty B I.	153. Sh. Shiga	Paty B и Shiga
577. Pseudomonas aeruginosa	665. Sh. Flexner	Pseudomonas aeruginosa
577. Ps. aerug.	153. Sh. Shiga »t«	Ps. aerug. и Shiga
577. Ps. aerug.	588. E. coli	Ps. aerug. и coli
577. Ps. aerug.	153. Sh. Shiga »t«	Pseudomonas aeruginosa
1178. Proteus vulg.	1171. Sh. Flexner	Proteus и Flexner
1178. Proteus vulg.	1181. Sh. Sonnne	Proteus и Sonne

Совсем иначе обстоит дело со штаммом Sonne, два раза подавивший штамм. S. typhosa при совместном культивировании. Здесь не может быть речи о »случайности«, об ошибке, о лабораторном заблуждении. По литературным данным шт. Sonne, как на это указывает также его антигенная структура, близко стоит к Salmonellae. Наши опыты над Salmonellae дока-

зали, что шт. S. typhosa принадлежит к легко подавляемым штаммам. Исчезновение последнего штамма, до некоторой степени, могла бы объяснить эти два факта. Окончательно же разрешить вопрос могут лишь надлежащие опыты.

Опыты с штаммами Pseudomonas дали только частичный результат, причина этого скрывается очевидно в сравнительно быстром росте этого штамма. Опыты в этом направлении требуют дальнейшей проверки и особенно расширения.

Опыты со штаммами Proteus дали соответствующий результат, однако и здесь можно указать на необходимость дальнейших опытов.

Кроме указанных опытов нами была проведена еще попытка культивирования определенного лабораторного штамма coli со штаммами других родов. Однако мы не считали возможным сообщить о результатах этих опытов, потому, что, как выяснилось: coli имеет значительно более крутую кривую размножения, чем остальные штаммы опыта и поэтому не дает им возможности для развития, отнимая от них необходимые питательные вещества. Поэтому нам кажется, что опыты такого рода могут дать результат только в том случае, если условия опыта соответствуют требованиям кривой размножения всех штаммов, участвующих в эксперименте в одинаковой мере. Вероятно из этого получается, что Pseudomonas aeruginosa имеющий также короткое время роста, при совместном культивировании с coli — остается до конца опыта, рядом с кишечной палочкой.

Во время опытов у нас появилась идея, что выбранные для характеристики антигенная структура, расщепление сахаров и вирулентность являются чересчур грубыми свойствами для того, чтобы изменения, появившиеся во время совместного культивирования, т. е. в постоянно меняющемся окружении, делать наглядными. Изменения этих трех показателей, если такие оказались, были очень колеблюшиеся и мало доказательны, как на это уже было указано. Мы ожидали, что в индивидуумах подопытных видов появляются такие новые, до сих пор несуществующие свойства, на основе чего возникается какой-то, известный уже, или еще неизвестный вид, подобно тому, как это получилось у В. Д. Тимакова, выраставший микробы на субстрате убитых микробных тел и после некоторого времени первые приняли свойства последних. Конечно, мы во время своих опытов не могли быть знакомы с опытами Тимакова. Мы делали подобный опыт, но у нас оба вида были живые, и исчезнувший штамм был привит опять и опять к оставшемуся штамму. Результаты видны из таблицы V.

Значит впервые появляются в ничтожном количестве, единичные колонии штамма Flexner, после двадцатого пассажа; позже число их несколько увеличивается, но далеко не достигает количества колоний шт. Sonne. Из этого можно сделать вывод, что антагонизм шт. Sonne относительно оставшихся единиц шт. Flexner прекратился; это только в том

Таблица V

Возобновленное совместное культивирование

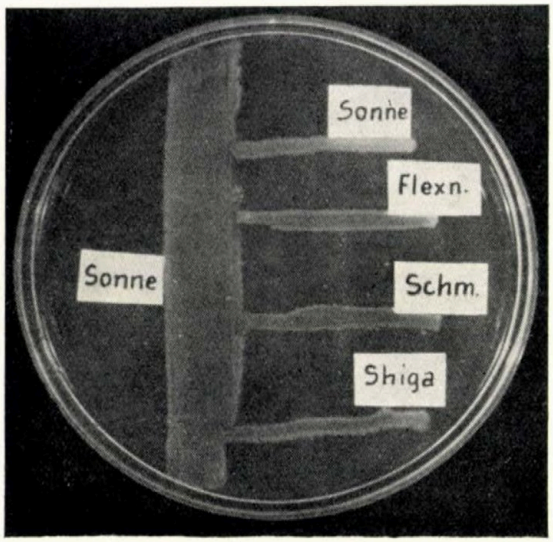
Серия пассажей	Исходные штаммы	После десяти пассажей остался
I.	656. Sonne I. + Flexner	Sonne
II.	656. Sonne II. + Flexner	Sonne и Flexner 1)
III.	656. Sonne III. + Flexner I.	Sonne
IV.	656. Sonne IV. + Flexner I.	Sonne и Flexner 2)
V.	656. Sonne V. + Flexner II.	Sonne и Flexner 2)
VI.	656. Sonne VI. + Flexner III.	Sonne и Flexner 2)
VII.	656. Sonne VII. + Flexner IV.	Sonne и Flexner 2)

1. ничтожное количество колоний Flexner.
2. малое количество колоний Flexner.

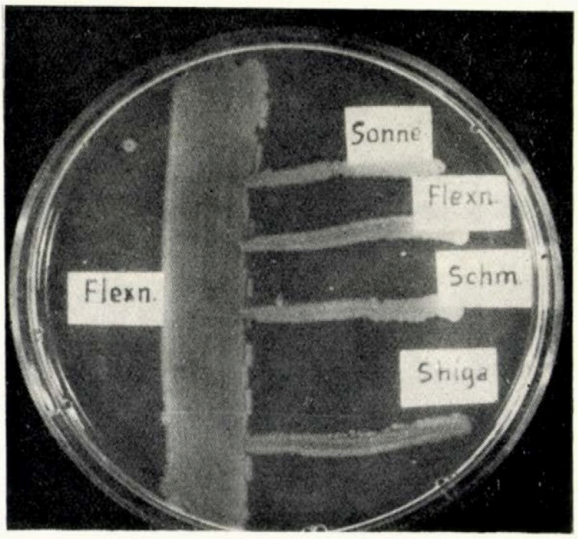
случае приемлемо, если полагаем, что шт. Sonne изменился в направлении штамма Flexner, а последний в направлении первого. Они не перешли друг в друга, а каждый из них усвоил новые свойства, что и они могли делать закономерно только в направлении друг к другу. Изменение не произошло во всех индивидуумах Flexner, ибо— как мы видели, — их число было значительно меньше числа колоний шт. Sonne, даже после повторения седьмого раза десятикратных пассажей.

*

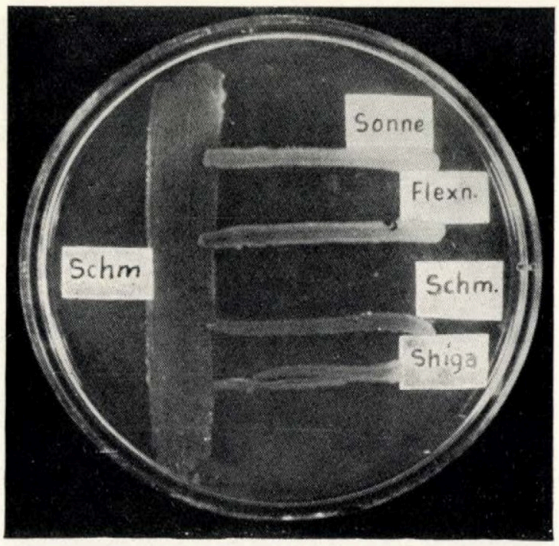
При разыскании причины исчезновения одного или некоторых штаммов можно было предполагать, что оставшийся штамм выделяет и передает в питательную среду определенный антибиотик, подавляющий рост остальных штаммов, или же убивающий другие штаммы. Для выяснения вопроса мы выбрали оригинальный опыт Флемминга на чашке Петри. Мы производили посев четырех штаммов Shigellae на чашки Петри с агаром с помощью платиновой петли в полосках, в разных комбинациях. Из предполагаемого штамма, как производителя антибиотика делали полоску в одном направлении, а из других, на которые предполагаемый антибиотик должен содействовать, — между собой параллельном, а на первые — в перпендикулярном направлении. Фотоснимки изготовленные с чашек Петри (фиг. 1—4) несомненно демонстрируют, что ни в одной комбинации не имеется никаких следов задержки роста. Поэтому мы с полной уверенностью можем отрицать присутствие антибиотически действующего вещества. Исчезновение штаммов не может быть причинено свеже-выделенным антибиотиком.



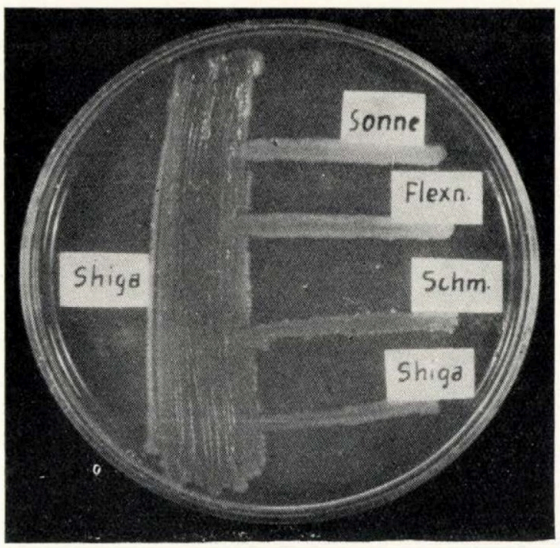
1



2



3



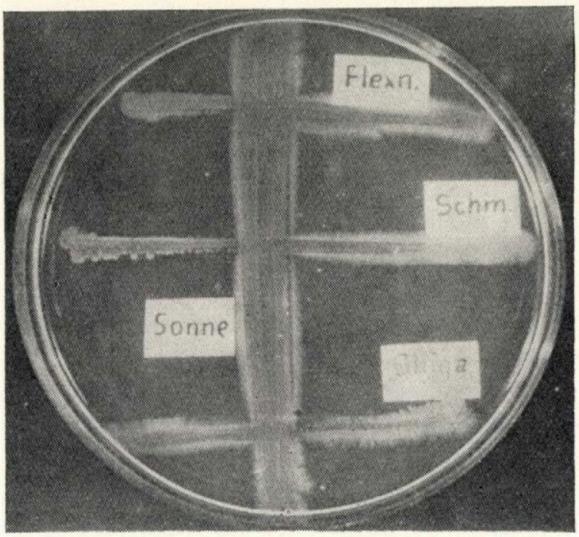
4

Фиг. 1—4. Опыты антибиотического действия с четырьмя видами Shigellae. Задержка роста не получилась ни в одной комбинации

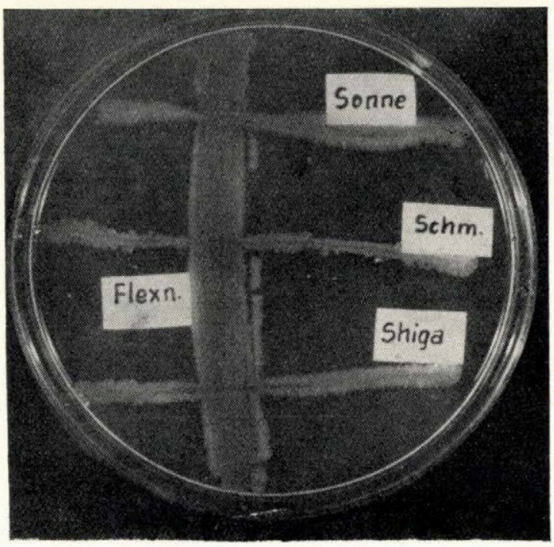
При удлинении перпендикулярных полосок, через первую полоску мы на точке скрещения ясно видим, какой штамм подавляет другой штамм потому что или линия »антибиотического« или же »подавляемого« штамма окажется непрерывной (фиг. 5—8). Непрерывная линия соответствует оставшемуся при совместном культивировании штамму. Таким образом простой методикой, на 24-часовом росте на агаре удалось демонстрировать антагонизм индивидуумов близко стоящих друг к другу штаммов Shigellae, принадлежащих к одному и тому же роду. Необходимо все же подчеркнуть, что методика годна пока только для опытов с Shigellae, и мы не думаем о ее обобщении.

Чтобы найти ответ на вопрос, что́ причиняет описанное явление, в дальнейшем мы обратились к электронному микроскопу. Нами были изготовлены снимки с палочек исходных штаммов, а потом каждодневные серийные снимки десятидневного совместного культивирования штаммов Sonne и Flexner, а также всех четырех штаммов. На основе полученных снимков можно было установить, что между индивидуумами четырех штаммов не появляются какие-нибудь выраженные различия, которые делали бы возможным точно разделять отдельные штаммы друг от друга. Подобным образом мы на довольно многочисленных серийных снимках не видели изменений, которые указали бы на гибель, растворение, распад отдельных палочек при одновременном благополучном состоянии других. Не удалось доказать такой методикой возникновение фагов, или же их нападение на микробные тела. Таким образом нам не удалось подойти ближе к установлению причины антагонизма бактерий, или же, если да, то только в отрицательном смысле. Возможно, что все это получилось так потому, что мы не выбирали правильного момента для изготовления снимков, хотя мы и пытались делать снимки например на 5,10 и 20 часу первого дня совместного культивирования. Возможно, что не получен результат потому, что мы вынуждены производить моментальный снимок с уже убитых микробов. Возможно также, что из-за немногочисленности палочек нам не удалось получить необходимую обзорную картину. Факт, что нужного результата — нет. Причиной этому может служить и то обстоятельство, что таким путем мы и не можем ожидать результата, так как явление не имеет морфологически осязаемую причину, или правильнее для этого наша техника слишком груба. Последнее представление, кажется мне, стоит ближе всего к истине.

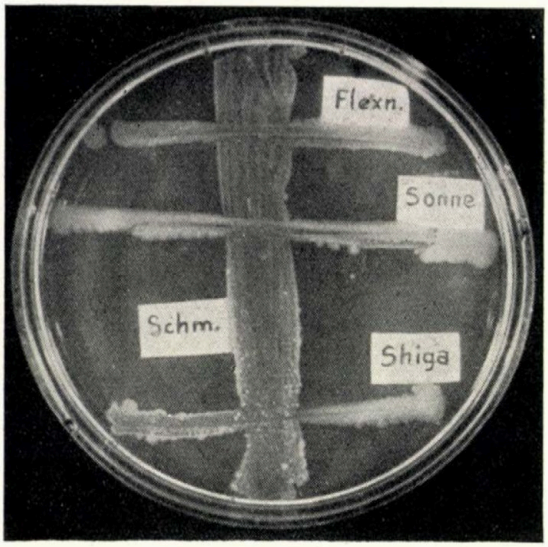
Некоторый интерес представляют собой три снимка из несколько дюжин, изготовленных нами снимков. Первый (фиг. 9) сделан с четвертого пассажа совместного культивирования штаммов Sonne и Flexner. Здесь видна сравнительно редкая картина двух палочек потому, что микробы имеют относительно правильную форму, видна оболочка и также тело клетки. Вторая картина (фиг. 10) из пятого пассажа. Палочки здесь разной



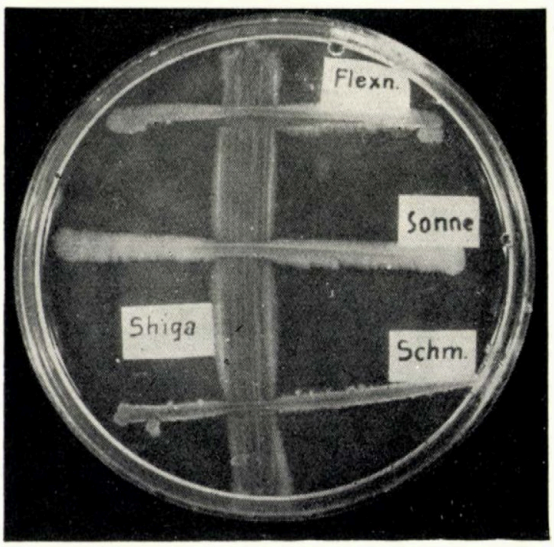
1



2



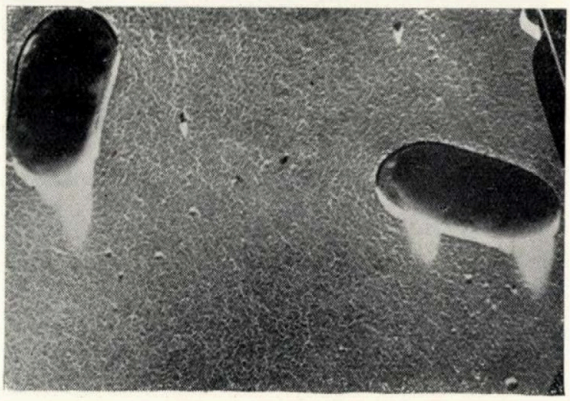
3



4

Фиг. 5—8. Антибиотического действия нет ни в одной комбинации. Пророст вертикальной или же горизонтальной линии указывает на остающийся антагонистический штамм в разных комбинациях

величины, с короткой, почти коккообразной до резко удлиненной, находящейся вероятно на пути к делению формы. Последняя картина (фиг. 11) — из восьмого пассажа — пожалуй менее красива, чем предыдущие. Обе палочки бобовидные, на одной стороне сильно втянутые, что может быть принято признаком начинающегося деления.

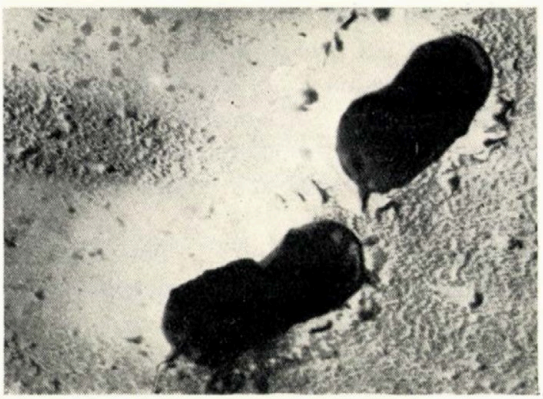


Фиг. 9. Комбинация Sonne—Flexner, IV. пассаж. Электронно-микроскопический снимок, увеличение 20 500 раз

Фиг. 10. Комбинация Sonne—Flexner, V. пассаж. Микробы разной величины. Электронно-микроскопический снимок, увеличение 27 200 раз

Наконец были произведены дальнейшие опыты для определения — или же исключения — действия фага. Прежде всего действовали в течение 15-и, или 40 минут ультразвуком на культуру дрожжевого бульона шт. Sonne. Выяснилось, что микробные тела не разрушались, после окончания процедуры 0,05 см³ культуры все еще содержало живые и поэтому выращиваемые единицы палочек. Поэтому мы перешли на исследование пропущенной через фильтр Seitz'а культуры. На дрожжевом бульоне —

всегда в количестве 50 см³ — выращивали параллельно, отдельно шт. Sonne и шт. Schmitz, а также и их смесь, всегда в троекратном опыте, из десяти пассажей каждый. После окончания каждой серии мы сделали высев на чашку Петри, и оказалось, что из смеси остался всегда только штамм Sonne. В начале новой серии из десяти пассажей мы естественно прибавили шт. Schmitz. К концу третьей серии как смесь, так и отдельные, контрольные культуры отфильтровались и фильтратом были произведены различные опыты. Фильтраты взялись в чистом виде или бульоном в одинаковом количестве или же в десятикратном разбавлении, к ним прибавились однодневные культуры шт. Sonne или Schmitz (на бульоне), в количестве одной



Фиг. 11. Комбинация Sonne—Flexner, VIII. пассаж. Начальное деление микробных тел. Электронно-микроскопический снимок, увеличение 31 500 раз

капли, или 0,25, или же 0,5 см³. После 24 часовой инкубации отдельный фильтрат шт. Sonne и шт. Schmitz в чистом виде и пополам с бульоном задерживает рост прибавленной к нему культуры, питательная среда остается прозрачной, но при высеве на чашку Петри с агаром прибавленный к ней штамм вырастает, т. е. фильтрат имеет бактериостатическое действие. Прозрачен остается также фильтрат культуры совместного выращивания с той только разницей, что на агаре ничего не вырастает, т. е. фильтрат не только задерживает рост прибавленного одноименного штамма, но даже и убивает его, правильнее уничтожает его жизнеспособность. Десятикратное разбавление фильтрата бульоном не только не убивает культуру, но даже не вызывает задержки роста, ни в одном из фильтратов. Задерживающее действие чистого или же разбавленного наполовину фильтрата, по нашему мнению, скрывается в том, что прошедшее 24-часовое выращивание истощало до определенной, очевидно высокой степени, питательное вещество среды, а в то же самое время передало туда продукты обмена веществ. Доказательством тому, что здесь не может быть речи о действии фага, служит

твердая среда агара, на которой фильтрат не причиняет ни »бляшки«, ни деформацию, ни отсутствие колоний, что при присутствии фага появилось бы не после употребления десятикратного, а несравненно более высокого разведения.

Ввиду того, что опыты того или другого порядка не дали положительного результата, кажется несомненным, что антагонизм имеет не химическую или морфологическую, а выраженно биологическую причину.

Здесь я укажу на начальные результаты наших свежих, еще не полностью законченных опытов. Мы их проделали с двумя видами протозой одного и того же рода, Endamoeba histolytica и Endamoeba coli. Они были привиты — отдельно и совместно — на жидкую крахмальную среду, а после 48-часового культивирования переведены на новую среду, а состояние опыта одновременно микроскопически контролировалось. Оба вида Endamoebae росли в контрольных, отделенных культурах хорошо, зато из пятого пассажа смеси Endamoeba histolytica уже исчезла. В другом более позднем опыте Endamoeba coli осталась в среде только сама — уже после четвертого пассажа.

Совершенно ясно, что данные опыты продолжаются тем более, что подобные опыты обещают особые возможности для подробных наблюдений.

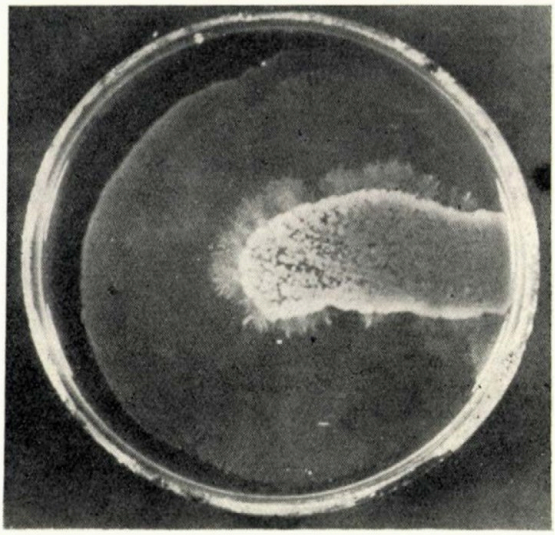
Результаты этого опыта со своей стороны также доказали общую годность тезиса Т. Д. Лысенко и дают нам повод, не рассматривать эти результаты опытов лишь узким результатом наших опытов с определенными микробными видами, а все более широким обобщением на микроорганизмы вообще.

Не могу окончить свой отчет без того, чтобы не указать на два опыта, с точки зрения антагонизма не давшие результата. Это необходимо делать и потому, что кажущаяся в них неудача указала как раз на серьезную часть наших ошибок и заодно и на то, как надо продвигаться в будущем путем исправления таких ошибок.

Мы предполагали производить опыты микробами рода Bacillus и для такой цели выбрали первоначально B. subtilis и B. anthracis с тем, чтобы после достижений с ними расширять свои опыты, вовлекая в опыт дальнейшие члены этого богатого рода. Мы старались пользоваться методикой предыдущих опытов: делать совместный посев на бульоне. В скором времени оказалось однако, что совместное культивирование в данном случае недостижимо, потому, что B. subtilis образовал на поверхности питательной среды пленку, а B. Anthracis опускается на дно пробирки и там растет. Этот опыт мы повторяли много раз, всегда с тем же результатом. Значит: два вида самостоятельно образовали »куртину«, разделенную культуру. Такой факт тоже отвечал определениям Т. Д. Лысенко. Им было сообщено по ботанике, что индивидуумы близких друг

к другу видов, принадлежащих к одному и тому же роду могут рядом продолжительно жить и развиваться только в куртинах, в разделенных гнездах. Куртина в нашем случае была изготовлена не искусственно, а она образовалась естественно, самостоятельно.

Мы пытались культивировать штаммы subtilis и anthrax совместно на твердой питательной среде, предварительно смешивая их в взвесь и навели каплю взвеси величиной в двухкопеечную монету на агар в чашке Петри. Заставить их таким образом совместно расти — нам не удалось. В середине



Фиг. 12. Естественное образование »куртины«. В середине: колонии B. subtilis, на периферии: B. anthracis

пятна образовались высокие, глянцевитые, влажные, сливающиеся между собой колонии, а с края пятна выросли продвигающиеся все дальше плоские, сухие, сливающиеся колонии. В центре оказались сенные палочки, а на периферии — палочки сибирской язвы (фиг. 12). Как видно, в данном опыте спонтанное образование куртины опять таки препятствовало появлению антагонизма.

Другой опыт был проведен микобактериями: Были вовлечены два патогенных (H_{37} rv и avium) и три сапрофитных (phlei, Rabinowitsch и Pellegrino) штамма. Микобактерии, особенно патогенные штаммы, как известно, значительно медленнее растут, чем остальные, здесь уже упомянутые штаммы, поэтому эти опыты длились значительно дольше остальных. Для одной инкубации требовалось 14 дней, а серия из десяти пассажей длилась почти пять месяцев. Совместные посевы делались попарно, шт. H_{37} rv в обязательном порядке и один из остальных четырех штаммов. К концу серии был

сделан высев на чашку Петри с питательной средой по Коронини. Кроме того мы проводили опыты на морских свинках, по 5 животных в одной группе. Животные заразились 0,001 мг влажного веса (высушенного между промокательной бумагой) каждой комбинации. Самый тяжелый результат был получен из комбинации H_{37} rv + phlei, другая комбинация, H_{37} rv + Rabinowitsch причиняла только легкие изменения с мало распространенными очагами, а остальные две комбинации не дали никаких макроскопических изменений у подопытных животных. Необходимо все же делать к этим результатам замечание, а именно, что между временем роста шт. H_{37} rv и остальных штаммов имеется очень большая разница, и нет обязательной необходимости предполагать антагонистическое действие для того, чтобы подавлять рост медленно растущего штамма H_{37} rv остальными штаммами. Поэтому мы не можем сказать, что этот опыт дал приемлемый, однозначащий результат.

*

Необходимо сказать несколько слов о наших ошибках, проявившихся во время наших опытов.

Опыты были поставлены с самого начала слишком широко и сразу хотели достичь чересчур многого. Поэтому работа размельчалась, дала много мелких результатов, зато не удалось заглянуть в сущность дела и разъяснить причину явления. Мы достигали нередко только предположения, и ставили перед собой далекую цель. Уж очень часто приходилось ссылаться на то, что необходимо продолжать или же повторять тот или другой опыт.

Нам представлялось, что одной единственной, простой методикой возможно будет у в с е х родов, правильнее у всех их видов получить одинаковые результаты, поэтому не было выделено необходимое внимание для методики. Сегодня мы знаем, что основную задачу, т. е. совместное культивирование разных видов мы можем достигать только с помощью разнообразной техники, в соответствии с разнообразными требованиями по питанию, по кривой роста, по способу культивирования и т. д. видов. Важно иметь питательные среды, о д и н а к о в о соответствующие к а ж д о м у штамму данного опыта, т. е. надо работать не э л е к т и в н ы м и, а по возможности общими питательными средами. Пока необходимо считать открытым вопрос, целесообразно ли выбрать в к а ж д о м опыте жидкую среду. Отдельным вопросом надо ставить частоту пересева. Чересчур ранний посев может задержать развитие какого-то штамма, очень длинный промежуток времени может довести до дегенерации культуры. До сих пор мы произвольно выбирали время. Надо искать правила и в этом вопросе, как и в числе пассажей.

Одним нашим основным недостатком является недооценка значения к р и в о й р о с т а отдельных штаммов, без чего мы можем путаться и

обольщатся лжерезультатами. Полагаем, что перед каждым опытом необходимо определение кривой роста выбранных штаммов и на основе ее надо определять начало и продолжение совместного культивирования. Нельзя считать безразличным начальное число микробов, наоборот, кажется, чтобы количество прибавленных к смеси микробов не было приблизительно, а точно одинаковое. Надо думать об исходной культуре из одной клетки, или вернее, из двух клеток.

Вообще необходимо составить точный план опытов, взвешивать достигнутое, критиковать и только после этого переходить на следующий опыт. Это можно сказать как раз потому, что нам кажется, несмотря на ряд ошибок, нами уже кое-что достигнуто и доказано и наши результаты безусловно обнадеживающие.

Есть еще одна кажущаяся ошибка: во всех наших опытах мы сделали все, чтобы наши микробы развивались при одинаковых условиях продолжительно. Может казаться, что мы отказались от главной цели, от направленного изменения природы в интересах человека. Мы не только не старались произвести таких изменений, а наоборот избегали возникновения таковых. Причина этому в том факте, что мы хотели исследовать стационарные условия совместного культивирования, определить правила, выходящие из этого, а для таких опытов нужны строго одинаковые условия по течению всего опыта. Но мы понимаем этот вопрос так, что постоянство является только одной стадией, одной фазой изменения. После теперешней фазы постоянства должно следовать его продолжение, изменение. Мы уверены, что достигнем и эту фазу.

ANTAGONISMUS DER INDIVIDUEN NAHESTEHENDER ARTEN DESSELBEN GESCHLECHTES IN DER MIKROBIOLOGIE II.

A. Havas u. Mitarbeiter:

ZUSAMMENFASSUNG

Die durchgeführten Versuche bewiesen die Stichhaltigkeit der These von T. D. Lissenko über den Antagonismus der Individuen verschiedener Arten, die zu *einem* Geschlecht gehören, zwischen den Arten des Geschlechts Salmonella, Shigella u. Endamoeba. Es wurde weiters bewiesen, dass die Rolle der einzelnen Arten im Antagonismus nicht gleich ist, sondern sie eine bestimmte Reihe bilden. Die Versuche erstreckten sich auf sechs Salmonella-Stämme, an der Spitze der Reihe stehen S. paratyphi B Schottmüller und S. typhi murium Breslau, am Ende S. paratyphi C Hirszfeld. Die Stämme Schottmüller und Breslau gelten nicht als selbständige Arten, sondern nur als Unterarten. Die Shigella-Reihe bildet sich folgends: Sh. Sonne, Flexner, (Stutzer-) Schmitz, (Grigorjev-) Shiga. In diesen Reihen unterdrücken die Individuen der vorstehenden Art im Wachstum die Individuen aller nachfolgenden Arten. Endamoeba coli unterdrückt das Wachstum der Endamoeba histolytica. Als Ursache der Erscheinung kann weder Bildung von Antibiotika, noch von Phagen eine Rolle spielen. Es wird eine biologische Ursache angenommen; die Individuen der erwähnten Stämme sind physiologisch gegenseitig unverträglich. — Die Individuen weit voneinander stehenden — zu verschiedenen Geschlechten gehörigen — Arten wachsen dagegen ohne weiteres nebeneinander (Salmonellae und Shigellae, Proteus u. Shigellae, Pseudomonas aerug. und E. coli usw.). — In den Versuchen mit B. subtilis und B. anthracis konnte die Bildung einer natürlichen »Kurtine« (Nest) beobachtet werden. — Die Versuche werden fortgesetzt.

REIZPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN ZILIATEN

I. ÜBER DAS AKTIONSSYSTEM VON PARAMECIUM

Von
B. PÁRDUCZ

Ungarisches Naturwissenschaftliches Museum, Budapest

Eingegangen am 10. August 1953

Einleitung und Problemstellung

Bei den Protisten steht die lebendige Substanz der nicht in einen Verband gezwungenen selbständigen Zellen von allen Seiten und in der Regel unmittelbar mit der Aussenwelt in Berührung. Offenbar auf diesen Umstand ist dann eine der charakteristischen Fähigkeiten der einzelligen Organismen zurückzuführen, nämlich dass sie auf die verschiedensten Einflüsse der Umgebung mit mannigfaltigen Tätigkeiten, insbesondere mit Bewegungsänderungen überaus empfindlich reagieren. Aus diesem Grunde vermochten zahlreiche pflanzliche und tierische Einzeller zum Versuchsobjekt der modernen physiologischen, medizinischen und pharmakologischen Laboratorien zu werden, an dem sich unter anderem die auf das Protoplasma ausgeübte physiologische Wirkung der verschiedensten Wirkstoffe, wie Organextrakte, Narkotika, Toxine, Hormone, Vitamine, Drogen usw. untersuchen liess. Ein schwerwiegendes Hindernis für ihre Verwendung als Versuchsobjekt in einem ausgedehnteren Kreise bestand aber darin, dass gerade die Gesetzmässigkeiten der Reizbarkeit auf der einzelligen Stufe der Organisation noch zum grossen Teil ungeklärt sind. Unser Wissen auf diesem Gebiete kann auch heute nicht viel günstiger charakterisiert werden als vor einem Vierteljahrhundert: man ist noch kaum über die sich auf das »Verhalten« des einzelligen Organismus beschränkenden einfachen Feststellungen hinausgekommen *(Köhler*, 1928).

Unter diesen Umständen ist es demnach verständlich, dass auch bezüglich des Wesens der Reizerscheinungen, bezüglich der Natur der sich im Inneren der einzelligen Organismen z. B. bei Ausführung einer Reizbewegung abspielenden Prozesse sich bisher kein einheitlicher, allgemein anerkannter Standpunkt ausbilden konnte.

In dieser Hinsicht begegnet man in der Literatur häufig der Anschauung, dass die Einzeller auf die verschiedensten Reizwirkungen einfach wie ein isolierter Muskel reagieren. Laut anderen Forschern hingegen kann angenommen werden, dass es sich bei den Reizerscheinungen der Protisten lediglich um eine einfache Erregungsleitung und — ohne zentrale Umschaltung — um eine

unmittelbar darauf folgende Auslösung einer Reaktion in der Erfolgsorganelle handelt. Es würde sich hier also ein ähnlicher Vorgang abspielen, wie wenn man etwa den efferenten motorischen Nerven eines höher entwickelten Metazoons direkt gereizt hätte. Schliesslich pflegt man gewisse charakteristische Reizerscheinungen, wo sich zwischen die Phasen der Perzeption und der Reaktion

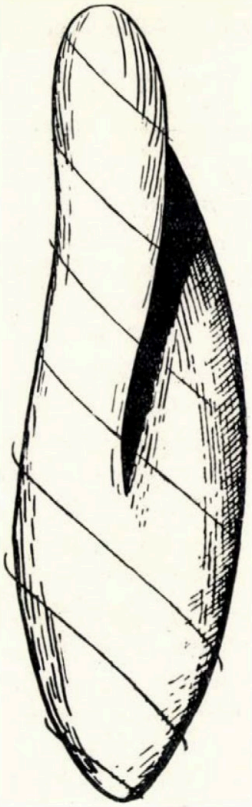


Abb. 1. Schematisiertes Bild der rechtsgewundenen Schraubengestalt von *Paramecium* (nach *L u d w i g*)

ein auffälliger erregungsleitender Vorgang einschaltet, zumindest vom physiologischen Gesichtspunkt gewöhnlich als Reflexe bzw. als Reflexoide *(Doflein*, 1916) zu deuten. In der Literatur begegnet man sogar auch Forschern, die bereits bei den Einzellern von Gewöhnung an den Reiz, von Summation der Reize, von Lernen durch Übung, von Assoziationsfähigkeit usw. sprechen, also von Erscheinungen, die bei den höheren Tieren und beim Menschen schon mit höheren Leistungen eines aus mehreren Zellen aufgebauten Nervensystems verknüpft sind.

Unser letztes Streben ist tatsächlich darauf gerichtet, über die sich auf das Benehmen des einzelligen Organismus beschränkende primitive Erkennt-

nisstufe hinauszugelangen und die Verhaltenslehre auch bei den Protisten womöglich zu einer wirklichen Reiz- bzw. Reflexoidphysiologie zu vertiefen. Es ist aber offensichtlich kaum angebracht — wie dies von einem Teil der Verfasser zu Recht betont wird — auf Grund von groben äusserlichen Ähnlichkeiten gewisser Erscheinungen d. h. auf Grund des Umstandes, dass auf dieselben Reizwirkungen sowohl bei den Einzellern wie auch bei den Metazoen

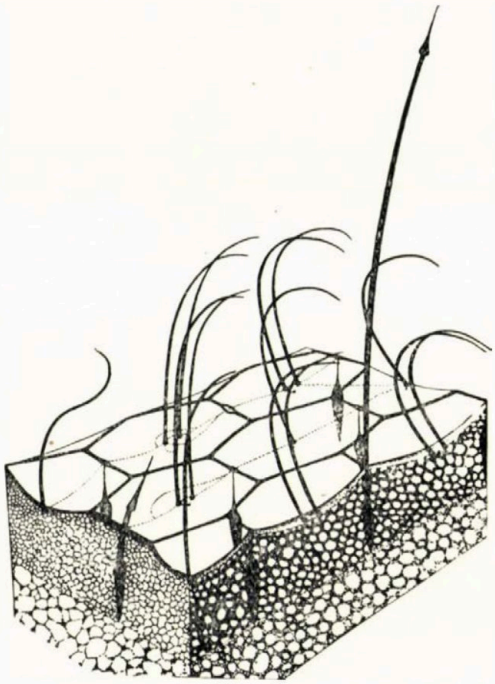


Abb. 2. Ein kleiner Ausschnitt aus der Aussenschicht von *Paramecium*. Das hexagonale Fasernetz um die Zilien fällt gleichzeitig auch mit den Umrissen der kleinen pellikulären Einsenkungen zusammen (nach *Hirsch*, modifiziert)

äusserlich ähnliche Endreaktionen auftreten, weitergehende Folgerungen zu ziehen. Im gegenwärtigen Stadium der Forschung ist also sowohl auf morphologischem als auch physiologischem Gebiete vor allem noch eine ausdauernde und minutiöse Sammlung von Angaben erforderlich. So müsste z. B. noch die Frage auf eindeutige Weise geklärt werden, ob die Protisten imstande sind, innerhalb ihres Körperplasmas spezielle, dem Reflexbogen der Metazoen teilweise analoge Strukturen herauszudifferenzieren. Andererseits ist aber — innerhalb der Teilprozesse der Reiz-Reaktionskette — die Klarstellung gerade jener besonderen Gesetzmässigkeiten und charakteristischen Eigenschaften anzustreben, die für die Protisten als selbständige Lebensweise führende einzellige Organismen in erster Linie kennzeichnend sind. Erst nach Sammlung eines hin-

reichend sicheren diesbezüglichen Tatsachenmaterials darf daran geschritten werden, die bei den Einzellern verwirklichte Art der Reizbeantwortung mit den Reizerscheinungen der Vielzeller meritorisch zu vergleichen. Erst dann wird man sich auch an die Klärung der für die vergleichende Physiologie bzw. für die allgemeine Biologie ausserordentlich interessanten Frage wagen dürfen, in welcher Form sich die qualitativen Unterschiede zwischen dem Protozoen- und Metazoenorganismus bzw. zwischen der Organelle und dem Organ auf dem Gebiete der Reizerscheinungen äussern.

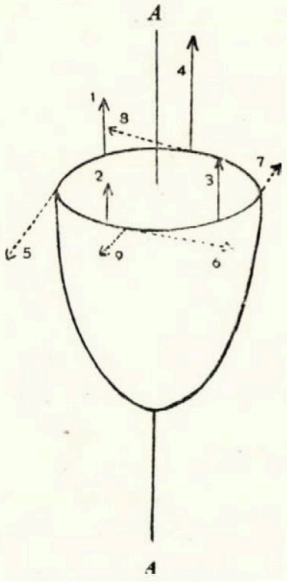


Abb. 3. Die Verteilung der lokomotorischen Kraftkomponenten des *Paramecium.* 1—4 stellen die Angriffspunkte des Longitudinal-, 5—8 die der Tangentialkomponenten und 9 den einer Radialkomponente dar (nach der von *Kalmus* modifizierten Abbildung *Ludwigs)*

Bei der Erforschung der Ursachen, der Bedingungen und des Ablaufes der im Begriffskreis der Reizbewegungen zusammengefassten Erscheinungen würde es zweifellos einen gewaltigen Schritt vorwärts bedeuten, wenn man die am weitesten differenzierten und zugleich die der mannigfaltigsten Bewegungsreaktionen fähigsten Einzeller, also die Ziliaten, in den Kreis eingehenderer Untersuchungen einbeziehen könnte. Die einzige, dafür aber ziemlich schwierige Vorbedingung hierfür besteht darin, dass man endlich einen klaren Einblick in den feineren Mechanismus der einzelnen Bewegungsreaktionen, d. h. in die Art des Zusammenwirkens der Erfolgsorganellen bei deren Ausführung gewinnt. Genauer ausgedrückt wäre es also notwendig, das durch verschiedene Reize beeinflusste Benehmen des Infusors nicht nur an den subjektiv beobachtbaren Bewegungsänderungen des Protozoenkörpers als Ganzes, sondern auch an den

Elementarorganellen des lokomotorischen Apparates selbst, d. h. an den Tätigkeitsänderungen der einzelnen Zilien analysieren zu können.

Wie aus der einschlägigen Literatur hervorgeht, hat bisher keine einzige der mit dieser Zielsetzung angewandten direkten und indirekten Forschungsmethoden (die Beobachtung der durch den Zilienschlag bewirkten Wasserströmung, die Dunkelfeld- und Phasenkontrastmethoden, die künstliche Verlangsamung der Zilienbewegung durch Narkotika bzw. durch Eindichtung des Mediums, die Mikrokinematographie usw.) die in sie gesetzten Hoffnungen vollständig zu erfüllen vermocht. Es war vor allem dieser Umstand, der neben der Aufmunterung durch ähnlich gerichtete Versuche von *Gelei* den Verfasser der vorliegenden Abhandlung dazu bewogen hat, sich diesem im Wesen auch heute noch verschlossenen Gebiet der Biologie von einer neuen Richtung her, nämlich durch Heranziehung von speziellen Fixations- und Färbungspräparaten zu nähern. Nachdem also ein gewisser Einblick in den verwickelten Fragenkomplex des Arbeitsmechanismus der einzelnen Zilie gewonnen war (*Párducz*, 1953), wurden die Untersuchungen bei Beibehaltung des dort verfolgten methodischen Weges neuerdings auf die Gesamtziliatur des Versuchstieres ausgedehnt. Als unmittelbare Aufgabe wurde ursprünglich als Ziel die Klarstellung der Frage gesetzt, wie sich die Einzelleistungen der Zilienarbeit bei der Verrichtung der normalen Bewegungsform sowie der verschiedensten Reizbewegungen des Tieres zu einer motorischen Gesamtleistung des Zilienkleides verbinden. Der Umfang des gesammelten Materials sowie gewisse Überlegungen liessen bald eine Einschränkung des Forschungsgebietes als angezeigt erscheinen. Als erster diesbezüglicher Schritt wurde also hier nur die Untersuchung *der durch das Versuchstier überhaupt vollführbaren hauptsächlichen Bewegungsformen*, also die Analyse der einzelnen Komponenten des *Jennings*schen Aktionssystems vorgenommen. Es wurde somit vorläufig die sowohl theoretisch als praktisch gleicherweise wichtige weitere Frage vernachlässigt, welche von diesen möglichen Bewegungsreaktionen als Folge einer bestimmten Reizwirkung jeweils zustande kommt.

Material und Technik

Als Untersuchungsobjekt wurde nach verschiedenen Überlegungen eines der häufigsten Versuchstiere der physiologischen Laboratorien, das *Paramecium* (*P. caudatum* und *P. aurelia*) gewählt, eine verhältnismässig grosse, gleichmässig von einem dichten Wimperkleid besetzte Ziliate, deren feinerer Körperbau und Lebenserscheinungen heute noch am meisten bekannt sind. Bei Berücksichtigung der geplanten späteren Untersuchungen über die Physiologie der Koordination spielte bei der Wahl dieses Versuchstieres auch noch ein anderer Umstand eine bedeutende Rolle.

Schon die einfache Beobachtung erbringt den Nachweis, dass beim *Paramecium* häufig eine völlige lokale Trennung von Perzeptions- und Reaktionszone vorliegt, dass also zwischen den beiden Endgliedern des Reizprozesses *ein erregungsleitender Vorgang eingeschaltet ist.* Zieht man nun in Betracht, dass das *Paramecium* auch unter den Ziliaten zu den höchstdifferenzierten Formen gehört, so darf man hier noch am ehesten annehmen, dass sich hier schon bestimmte vorgebildete Bahnen im Interesse einer raschen und gerichteten Fortleitung der Erregungsimpulse herausdifferenziert haben.

Zum besseren Verständnis der zu behandelnden Bewegungserscheinungen erscheint es angebracht, vor allem die charakteristische Gestalt des Versuchstieres sowie die wichtigeren morphologisch-topographischen Daten und Zahlenverhältnisse seiner Erfolgsorganellen kurz zu behandeln.

Obwohl der *Paramecium*-Körper in groben Umrissen eine im grossen und ganzen regelmässige Spindelform aufweist, zeigte der Aufbau beider untersuchter Arten — infolge der besonderen Ausbildung des vorderen Körperendes — eine zum Teil asymmetrische Form (Abb. 1). Die sich auf der ventralen Seite nach vorne links öffnende Mundgrube ist nämlich leicht nach der morphologisch rechten Seite des Tieres verschoben und befindet sich gewöhnlich etwas hinter der Körpermitte. Sie setzt sich nach vorne links in einer immer flacher werdenden Einsenkung (Mundfeld, Peristommulde) fort, die sich allmählich verbreiternd im linken Vorderende des Tieres ausläuft. Der rechte Rand der Mulde ist steil, während der linke sanft in die Oberfläche des Körpers übergeht, so dass das Vorderende im ganzen eine steil rechtsgewundene Schraube darstellt *(Ludwig,* 1929). Diese Ähnlichkeit wird noch durch den Umstand erhöht, dass das mit dem Beginn des Mundfeldes zusammenfallende Vorderende des Tieres links schräg abgeschnitten ist, während es rechts vom Mundfeld ein wenig rüsselartig vorspringt.

Die ganze Körperoberfläche ist fein skulpturiert, u. zw. derweise, dass sich in der Länge fortlaufende Pellikulaleisten, die in regelmässigen Abständen von alternierenden Querleisten verbunden werden, kleine quadratische bzw. polygonale Felderchen bilden (Abb. 2). Diese Einsenkungen sind — abgesehen von der Ventralseite — im grossen und ganzen in meridionalen Reihen so angeordnet, dass jedes von ihnen im Vergleich zu dem in der benachbarten Reihe befindlichen etwas nach vorne bzw. hinten verschoben ist. In jedem einzelnen Grübchen befindet sich im allgemeinen ein in die Pellikula versenkter Basalkörper und die daraus entspringende Zilie. Am vorderen Körperende sowie fast an der ganzen Bauchseite, hauptsächlich jedoch in der Peristommulde treten die Zilien paarweise auf. Die Zilienreihen folgen somit dem Verlauf der Pellikulagrübchen und ordnen sich derart gleichfalls in Längsreihen an. An der Bauchseite besteht insofern ein Unterschied, als die Zilienreihen hier den Mundeingang bogenförmig umgeben und sich vor und hinter dem Mund in einer Nahtlinie vereinigen (Abb. 4). Besonders der Ablauf der links vom Schlundtrichter gelegenen Zilienreihen ist charakteristisch. Diese biegen sich nämlich in einer recht starken Krümmung vor den Mundeingang und bilden auf diese Weise in quer zur Achse des Mundfeldes gerichteten Reihen dessen Bewimperung.

Von den als Versuchsobjekt verwendeten zwei *Paramecium*-Arten betrug die Körperlänge der grössten Exemplare von *P. caudatum* 220 μ und der grösste Durchmesser 50 μ. An einem solchen Exemplar ziehen sich im Durchschnitt 110 Zilienmeridiane entlang, von denen aber nur ungefähr zwei Drittel die Pole erreichen, während die übrigen, die sog. unvollständigen Reihen an der erwähnten Naht vorzeitig endigen. In einer vollständigen Zilienreihe befinden sich ungefähr 100—110 Zilien, in den unvollständigen ungefähr die Hälfte, so dass die ganze Ziliatur des Tierchens aus rund 9000—10 000 Zilien besteht. Der Abstand der einzelnen Zilien voneinander — sowohl in der Längs- wie auch in der Querrichtung — schwankt je nach der Körpergegend zwischen 2 und 2,5 μ. Ihre Dicke beträgt etwa 0,3 μ und ihre Länge 12—14 μ. Die sog. Schwanzzilien des hinteren Körperendes sind etwas länger, sie messen gegen 18 μ.

Die vorliegenden Untersuchungen schliessen sich in Hinblick auf das angewandte mikrotechnische Verfahren eng an die vor mehr als einem Vierteljahrhundert begonnenen und leider allzufrüh unterbrochenen bahnbrechenden Forschungen von *Gelei* (1926, 1926—27) an. Die von ihm zum Nachweis der fixierten Bewegungsformen der Zilien ausgearbeitete Osmium-Toluidin-

blaumethode wurde in den letzten Jahren durch den Verfasser wesentlich modifiziert *(Párducz*, 1952a). Die Umgestaltung der Methode zielte neben der Beibehaltung und sogar stärkeren Herausarbeitung des Prinzips der Schnellfixierung in erster Linie auf die Vereinfachung der Behandlungstechnik, auf die Verkürzung ihrer Dauer sowie auf die Verminderung des allzu hohen Verlustprozentsatzes ab. So wurde an Stelle der Fixierung mit Formol-Osmium die energischer wirkende Fixierung mit Sublimat-Osmium und an Stelle der Färbung mit Toluidinblau ein schnelles, progressives Eisenhämatoxylin-Verfahren eingeführt. Es blieben dabei jedoch sämtliche Vorteile der »in toto« Untersuchungsweise, durch welche sie sich der Schneidetechnik gegenüber auszeichnet, erhalten.

Das Problem einer naturgetreuen Stabilisierung der Zilienbewegung

Der Verfasser war sich von allem Anfang an der Tatsache bewusst, dass eine Methode, bei der zur Erklärung der Dynamik einer Zellorganelle von einem toten Material auf das wirkliche, lebendige Geschehen gefolgert werden muss, viel zu umständlich ist, und dass beim Auswerten der Präparate trotz der grössten Umsicht gewisse Fehler schwer zu vermeiden sind. Der Erfolg der angewandten Methodik steht und fällt in erster Linie mit dem Gelingen einer lebensgetreuen Fixation.

Wenn es mit Hilfe der angewandten Methode gelingen sollte, die Gesamtziliatur des sich bewegenden Infusors gleichzeitig und tatsächlich im Moment der Einwirkung des Fixationsmittels zu stabilisieren, so würde man zweifelsohne in den Besitz eines Verfahrens gelangen, das vor allem die Klärung des der normalen Ortsveränderung dienenden Zilienmechanismus stark vereinfachen würde. In diesem Falle könnten nämlich die in einer bestimmten Phase ihrer physiologischen Tätigkeit festgehaltenen Bewegungselemente — nach einer elektiven Färbung — bequem und eine beliebig lange Zeit studiert werden. Die neu ausgearbeitete Fixationstechnik ermöglicht aber auch, die Bewegung der Untersuchungstiere sozusagen bis zum Moment der Erstarrung im Mikroskop zu kontrollieren. So scheint es demnach auch keine unerfüllbare Aufgabe zu sein, die zu irgendeiner Bewegungsreaktion gehörige geregelte Zusammenarbeit der Zilien auf »fixierten Momentaufnahmen« von dokumentarischer Treue festzuhalten. Hierzu ist theoretisch lediglich die Erfüllung einer einzigen Bedingung notwendig. Man braucht nämlich nur mit Hilfe von künstlich angewandten Reizwirkungen der Reihe nach und womöglich an sämtlichen in der Wasserprobe befindlichen Individuen die einzelnen Bewegungsreaktionen auszulösen und dann im entsprechendsten Zeitpunkt das Fixationsmittel einfach wirken zu lassen. Selbst wenn es nicht gelingen sollte, die zu studierende Bewegungsform an sämtlichen Exemplaren experimentell hervorzurufen, so können die gewünschten Individuen auf Grund eines Vergleiches ihrer prozentualen Häufigkeit zweifelsohne leicht in den Präparaten gefunden werden. Letztlich wird es also auch in diesem Falle genügen, die Analyse der die einzelnen Bewegungsformen kennzeichnenden Zilienwellenmuster auszuführen.

In der Wirklichkeit ist der Weg und die Weise der Untersuchungen nicht ganz so einfach. Die Schwierigkeit wird — wie dies zu erwarten war — in erster Linie durch die nicht genügend schnelle Fixationswirkung verursacht. Weder die Osmium-Hämatoxylinmethode noch die einzige bisher ausgearbeitete Variante der Schnellfixierungsverfahren sind nämlich imstande, an sämtlichen behandelten Individuen den ausserordentlich labilen Schlagmodus der Zilien tatsächlich im Augenblicke der Fixation zu stabilisieren. Anstatt dessen kommt eine besondere Modifikation der lebensgetreuen Fixation zustande. Es steht nämlich einerseits fest, dass infolge der Wirkung des Fixationsgemisches sämtliche Zilien der Körperfläche gleichzeitig, in ihrer natürlichen Bewegungsstellung und im Zustand einer koordinierten Zusammenarbeit festgehalten werden — in dieser Beziehung ist also die Fixation zweifellos lebensgetreu. Die Bewegungsform selbst, die sich aus der Schlagrichtung der einzelnen Zilien ergibt, die also das Tier im Moment der Erstarrung ausgeführt hat, entspricht jedoch andererseits in der Regel nicht der Bewegung, die im Mikroskop am lebenden Tier unmittelbar vor der Fixation beobachtet wurde. Die Ursache für diese interessante Erscheinung dürfte wahrscheinlich darin zu suchen sein, dass das Fixationsmittel seine Wirkung auf das lebendige Protoplasma niemals unmittelbar, sondern immer nur durch eine zumindest dünne, dazwischenliegende Wasserschicht ausüben kann. Auf diese Weise

fällt bei den meisten Individuen der Moment der Anwendung des Fixationsmittels nicht mit dem Augenblick der endgültigen Erstarrung zusammen. Die dazwischenliegende, ausserordentlich kurze, nur den Bruchteil einer Sekunde dauernde Periode genügt jedoch, dass mit der technischen Ausführung der Fixation zusammenhängende, teils mechanische (Flüssigkeitsströmungen), teils chemische (primäre Wirkung des sich verdünnenden Fixationsmittels) Veränderungen auf die Untersuchungstiere als Reize einwirken. Das Zilienkleid der Mehrheit der fixierten Individuen spiegelt infolgedessen nur die Momentaufnahmen der durch diese bei der Fixation auftretenden Reizwirkungen ausgelösten Bewegungsreaktionen wider.

Die bisherigen Untersuchungen weisen darauf hin, dass zwischen den vor der Fixation beobachteten und in den Präparaten erhaltenen Bewegungsformen ein enger Zusammenhang besteht. Auf diese Weise ist es in vielen Fällen auch heute möglich, schon im vorhinein zu sagen, in welcher Form ein gewisser Bewegungsmodus nach der Fixation im Präparat zum Ausdruck kommen wird. In der Praxis werden aber die erhaltenen Bilder nur dann von Wert sein, wenn es gelingt, ihre Übereinstimmung mit den tatsächlichen, auch an den lebenden Objekten beobachteten Bewegungsformen nachzuweisen.

Natürlich ist hierbei noch ein wichtiger Umstand zu berücksichtigen, der die Arbeit der Analyse und Auswertung beträchtlich erschwert. Da nämlich die Fixationsreize zweifellos für die Tiere besondere Verhältnisse schaffen, kann man sich leicht vorstellen, dass die erhaltenen Fixations-Färbungsbilder nicht den natürlichen Bewegungsformen des Infusors entsprechen, sondern nur gesetzmässige, aber unnatürliche Reaktionen auf bestimmte mikrotechnische Eingriffe darstellen.

Mit dem Wirkungsmechanismus des Fixationsreizes hat sich der Verfasser der vorliegenden Abhandlung bereits in einer gesonderten Mitteilung befasst *(Párducz*, 1952b). Als Ergebnis dieser Untersuchungen wurde seinerzeit der Schluss gezogen, dass beim Studium der Bewegungsphänomene der *einzelnen* Zilien diese Unzulänglichkeit der Fixationstechnik wahrscheinlich keine besondere Rolle spielt, da das Grundprinzip der Zilienarbeit während jeder Bewegungsform im Wesen unverändert bleibt. Bei der Zurückführung der Bewegungsformen des Protistenkörpers auf die Tätigkeit der Gesamtziliatur ist indessen bereits eine grössere Umsicht geboten.

Betrachtet man die mit Hilfe der Osmium-Hämatoxylinmethode erhaltenen Präparate, so ergibt sich jedenfalls auch hier als erster Eindruck, dass die Mannigfaltigkeit der fixierten Bewegungsbilder völlig der Vielfalt der Bewegungen entspricht, die man an einem *Paramecium* in seiner natürlichen Umgebung beobachten kann. Den Anzeichen nach tritt infolge der Einwirkung des Fixationsreizes nur in der prozentualen Häufigkeit der Bewegungsformen eine bedeutende Verschiebung ein, u. zw. zugunsten von Bewegungsreaktionen, die an lebenden Tieren seltener wahrgenommen wurden. So wird die Mannigfaltigkeit der erhaltenen Wellenmuster besonders durch jene interessanten Bilder erhöht, die den Übergang einer gewissen Bewegungsform in eine andere festhielten. Gleichzeitig mahnt aber der Umstand zur Vorsicht, dass z. B. die an den lebenden Tieren am häufigsten anzutreffende, doch anscheinend ausserordentlich labile Bewegungsform in den Präparaten gewöhnlich nur nach langwierigen und systematischen Suchen gefunden werden kann.

Der verwickelte Fragenkomplex der »physiologischen Artefaktenbildungen« erfordert also — insbesondere bei spezifischen reizphysiologischen Untersuchungen — noch jedenfalls eine weitere eingehende Bearbeitung. Im vorliegenden Falle soll jedoch — unabhängig von der Intensität oder Qualität der Reizwirkungen — vorläufig nur die Frage untersucht werden, *welche die Bewegungsformen sind, die das Versuchstier* auf der gegebenen Organisationsstufe *mit Hilfe seines Lokomotionsapparates überhaupt auszuführen imstande ist.* Eine derartige Einschränkung des Forschungsthemas gestattet es jedoch, diesmal von einer näheren Untersuchung des interessanten Problems der mit der Fixation verbundenen Reizwirkungen abzusehen.

Zur Verminderung der bei der angewandten statischen Arbeitsmethode unvermeidlichen Fehlerquellen bzw. zur Kontrolle der aus den Präparaten entnommenen Angaben wurden, wo es nur möglich war, die modernen Verfahren der Lebenduntersuchungen (Stereoskopie, Dunkelfeld- und Phasenkontrastmethode) in Anspruch genommen.

Faktoren, welche die Bewegungsform beeinflussen

Über den Einfluss der charakteristischen Körperform des *Paramecium* auf die Bewegungsbahn hat sich in erster Linie *Ludwig* (1928, 1931 und 1932) in mehreren Mitteilungen befasst. Er gelangte zur Feststellung, dass die steuernde Wirkung der Körpergestalt des Infusors gegenüber den Wimper-

kräften fast vollständig in den Hintergrund tritt. In völliger Übereinstimmung mit der Ansicht *Ludwigs* hält es der Verfasser für notwendig, diesbezüglich folgende Tatsachen besonders hervorzuheben.

Die Bohrerform des Tierkörpers wirkt bei jeder Vorwärtsbewegung, bei welcher die Richtung der Schraubenbahn nicht genau mit dem Ablauf der Peristommulde zusammenfällt, wenngleich in geringfügigem Ausmass, aber dennoch in jenem Sinne bremsend, dass sie den Körper in die seiner Schraubenform entsprechenden Bahn zu zwingen bestrebt ist. Neben der normalen lokomotorischen Kraftleistung des Zilienkleides kann jedoch dieser bremsende, den Charakter der Bewegungsbahn zu beeinflussen bestrebte Faktor nicht zur Geltung kommen. Sobald sich aber der Widerstand des Mediums beträchtlich erhöht — z. B. infolge der Zunahme der Viskosität —, so tritt dieser Faktor sofort in Erscheinung und zwingt auch die Zilien zu einer Änderung ihrer Schlagrichtung. Auch durch chemische Reize kann eine solche Änderung des Windungssinnes hervorgerufen werden. Bei ihrer Auslösung spielt indessen — wie später gezeigt werden soll — die schraubenförmige Körpergestalt wahrscheinlich keine unmittelbare Rolle.

Ebenfalls eine besondere Behandlung erheischt die Rolle der den Schwanzfortsatz bildenden Zilien. Diese Schwanzzilien befinden sich bei der thigmotaktischen Niederlassung des Tieres in Ruhestellung und bilden ein garbenförmig auseinandergespreiztes, straffes Zilienbündel. Ihre Bewegungsfähigkeit ist ihnen jedoch nicht vollständig verlorengegangen, wie dies von den meisten Autoren angenommen wird. Bei stärkeren Reizen können nämlich lebhafte Schlagbewegungen wahrgenommen werden (z. B. an Individuen, die von *Didinium* angefallen wurden und sich mit allen Kräften zu befreien versuchten). Es kann somit zu Recht die Frage aufgeworfen werden, ob diese kräftiger entwickelten Zilien nicht auch während der normalen Fortbewegung des Tieres eine aktive Tätigkeit ausüben. Ihre terminale Lage schliesst indessen diese Annahme schon von vornherein aus. Andererseits sind ihre Masse nicht so bedeutend, als dass sie als Bewegungsstabilisatoren praktisch in Betracht kommen könnten. Es verbleibt somit noch die Möglichkeit, dass sie in ihrer Gesamtheit einen die Richtungsänderung des Tieres lenkenden Steuerapparat bilden. Aus der Untersuchung der Präparate geht aber hervor, dass auch diese Zilien während der Bewegung des Tieres ihre für die Dauer der Thigmotaxis angenommene straffe, elastische Haltung verlieren und dass ihre Gestalt sowie ihre Anordnung sich je nach der momentanen Bewegungsart passiv verändern. So bilden sie denn je nach dem Charakter der Vorwärtsbewegung ein etwas nach rechts oder links gewundenes und sich in der Richtung der Längsachse des Körpers nach hinten erstreckendes, lockeres Geflecht (Abb. 27). Während der Richtungsänderung oder am Orte erfolgenden Ausweichsbewegung des Tieres biegen sie sich gleichfalls infolge des Mediumwiderstandes nach der Seite aus. Beim Zurückschwimmen löst sich das Geflecht auf, so dass sich die einzelnen Schwanzzilien im Bogen

in der Richtung des Vorderendes des Körpers zurückkrümmen (Abb. 43). Das passive Nachgeben ihrer Gestalt an die Bewegungsänderungen des Körpers zeigt also deutlich, dass sie in der Steuerung des Körpers keine Rolle spielen können. In Zweifelsfällen bedeuten sie aber einen nützlichen Anhaltspunkt, wenn nämlich die Frage entschieden werden soll, während welcher Bewegungsform das Zilienkleid der erstarrten Tiere stabilisiert wurde.

Abgesehen von den oben beschriebenen Ausnahmefällen darf also im Einklang mit *Ludwig* die Behauptung aufgestellt werden, dass die jeweilige Bewegungsform des *Paramecium* einzig und allein durch die Verteilung und Richtung der Wimperkräfte bestimmt wird.

Für die bisher zum grossen Teil auf einfachen Beobachtungen, Modellversuchen und theoretischen Berechnungen beruhenden bewegungsphysiologischen Untersuchungen bedeutet gerade in diesem Punkt die Heranziehung der mit Hilfe des Schnellfixierungsverfahrens gewonnenen, objektiven Momentaufnahmen eine bedeutende Hilfe. Es ist das grosse Verdienst von *L u d w i g* (1929, 1931), dass er die durch die Zilienbewegung auf den Körper durch Rückstoss ausgeübten Bewegungsimpulse genau analysierte und dann den möglichen Kombinationen der lokomotorischen Teilkomponenten auch die wichtigsten beobachteten Bewegungsformen von *Paramecium* zuordnete. In gegebenen, konkreten Fällen konnte jedoch bisher auf die *tatsächliche Verteilung* der wirksamen Kräfte, also auf die je nach der Körpergegend eventuell verschiedenartig geregelte Zusammenarbeit des Zilienkleides — mangels verlässlicher Angaben — zumeist nur aus der subjektiv beobachteten Bewegungsform des Tieres mehr oder weniger genau gefolgert werden. An den fixierten und gefärbten Präparaten kann man dagegen an der ganzen Körperfläche des Tieres *den momentanen Tätigkeitszustand sogar der einzelnen Zilien oder Ziliengruppen lebensgetreu erhalten und in ihren Einzelheiten bequem studieren.* Auf diese Weise ist es also möglich, einen genauen Einblick in die Verteilung und die Grössenverhältnisse der auf den Körper im Augenblick der Erstarrung einwirkenden motorischen Kräfte zu gewinnen.

Bei der Rekonstruktion der entsprechenden, also im Augenblick der Fixation ausgeübten Bewegungsform aus den fixierten Bewegungsbildern gewähren die *Ludwig*schen Schemata (1929), welche die zu jeder möglichen Verteilung der lokomotorischen Kräfte gehörige Bahnform angeben, einen wertvollen Anhaltspunkt. Man braucht nur einfach auf seiner, die untere Körperhälfte des *Paramecium* darstellenden Abbildung an Stelle der einzelnen lokomotorischen Komponenten (Abb. 3 ; 1—9) für den Ablauf der Zilienwellen der entsprechenden Körperteile und für die Intensität des Zilienschlages die aus den mikroskopischen Bildern abzulesenden Angaben einzusetzen. Daneben bedeutet — besonders bei der Identifikation der auf einer lokalen Tätigkeitsveränderung der Ziliatur beruhenden Bewegungsformen — auch die Beobachtung jener in Bewegungsveränderungen zum Ausdruck kommenden Reak-

tionen eine grosse Hilfe, die durch verschiedene Reizstoffe und an den mit dem verdünnten Fixationsmittel selbst zusammengebrachten Tieren experimentell, regelmässig ausgelöst werden können.

Die charakteristischen Zilienanordnungen der fixierten Exemplare

Nach einer systematischen Überprüfung und Auswertung der Präparate stellte es sich heraus, dass die Mannigfaltigkeit der fixierten Bewegungsbilder bei weitem keine Unregelmässigkeit darstellt : aus dem scheinbaren Wirrwarr lassen sich verschiedene charakteristische Typen der Wellenmuster herausschälen. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden im folgenden die fixierten Exemplare nach den am häufigsten wiederkehrenden Anordnungen der Zilienwellen gruppiert. Zum grössten Teil wurden nur jene Individuen in Betracht gezogen, an welchen die durch die Bewegungsstellung der Körperzilien veranschaulichten Wirkkräfte mit den an lebenden Tieren bisher beobachteten Bewegungsformen in Übereinstimmung gebracht werden konnten.

1. Normale Fortbewegung in linksgewundener Schraubenbahn

Nach den Literaturangaben ist die Fortbewegung in linksgewundener Schraubenbahn die normale, durch Reize nicht beeinflusste Lokomotionsart des *Paramecium*. Mit dieser am häufigsten zu beobachtenden Bewegungsform und mit den Bedingungen seines Zustandekommens hatte sich *Jennings* als erster befasst. Er war nämlich der erste, der den Versuch machte, die charakteristische Schraubenbahn der Mikroorganismen aus der Schlagtätigkeit des Geisselapparates bzw. des Zilienkleides abzuleiten.

Jennings (1914) stellte vor allem fest, dass bei der Normalbewegung des *Paramecium* die Zilien nicht genau rückwärts, sondern gleichzeitig auch etwas schräg nach rechts schlagen. Infolge ihrer Tätigkeit wird also der Körper geradlinig nach vorwärts getrieben, wobei er zugleich um seine Längsachse, und zwar nach der linken Seite rotiert. Da aber die Wimpern der Peristommulde immer kräftiger schlagen als die der übrigen Körperoberfläche und ihre Strudelung fast genau nach rückwärts erfolgt, so hat dies zur Folge, dass das Vorderende während der Bewegung aus der Richtung der Längsachse des Körpers ständig nach der aboralen Seite abgetrieben wird. Aus der Kombination der Wirkung beider Zilienarten (d. i. der Körperzilien und der Peristomalzilien) resultiert dann die tatsächliche Bewegungsform des *Paramecium*, nämlich das Schwimmen in einer räumlichen Spirale mit gerader Achse. Infolge der Drehung um die Längsachse wird nämlich erreicht, dass die Abweichungen des Vorderendes sukzessiv und gleichmässig nach allen Richtungen des Raumes erfolgen und

sich so gegenseitig ausgleichen. Die Fortbewegung in einer Schraubenbahn ermöglicht also dem Tiere — trotz der asymmetrischen Verteilung der Wimperkräfte —, eine bestimmte Richtung im Wasser einzuhalten. Gleichzeitig lenkt *Jennings* die Aufmerksamkeit noch auf einen anderen Vorteil, den diese Fortbewegungsart dem Tiere einbringt. Nach ihm erzeugt nämlich der Schlag der Peristomalzilien ständig einen auf die Mundöffnung hin gerichteten Wasserstrudel. Da aber das Vorderende des Körpers sich infolge der Schraubenbewegung immer anderen Seiten zukehrt, so werden durch die kegelförmig rückwärts gezogene Strömung dem *Paramecium* neben Nahrungsteilchen ununterbrochen auch Reizstoffe bzw. »Proben« aus seiner Umgebung zugeführt. Auf diese Weise ist das *Paramecium* imstande, auf jede neue Beeinflussung zu reagieren, noch bevor es wirklich in diese veränderte Umgebung eingedrungen ist.

Diese gefällige Erklärung von *Jennings* — die auch in Fachkreisen allgemein akzeptiert wurde — hat besonders *Ludwig* (1929) angegriffen. Er wies mit Nachdruck darauf hin, dass die Vorstellung, wonach die tatsächliche Schraubenbahn durch die stärkere Strudelung der Peristomalzilien bewirkt wird, theoretisch völlig irrig ist. Wenn nämlich die Ventralseite des Körpers lokomotorisch wirksamer wäre als die Dorsalseite, so würde das *Paramecium* in eine Schraubenbahn gezwungen werden, bei deren Zurücklegung seine Dorsalseite — im Gegensatz zur Wirklichkeit — dauernd der Schraubenachse zugekehrt wäre. *Ludwig* stellte demgegenüber mit Entschiedenheit fest, dass während der normalen Schwimmbewegung nur die lokomotorische Kraftleistung der Dorsalseite im Übergewicht sein kann, u. zw. sowohl in Hinsicht auf die translatorische als auch auf die rotatorische Kraftkomponente.

Laut seiner Feststellungen wird diese asymmetrische Verteilung der Ruderkräfte einesteils dadurch verursacht, dass die Schlagkraft der dorsalen Körperzilien überhaupt grösser als die der ventralen ist. Andernteils kann das Übergewicht der Ruderkräfte auf der Dorsalseite auf die besondere Schlagtätigkeit der Peristomalzilien zurückgeführt werden. Die Tätigkeit dieser Zilien wirkt nämlich bremsend auf die eine Linksdrehung des Körpers anstrebende rotatorische Kraftkomponente der nach rechts rückwärts ausschlagenden Körperzilien, u. zw. dadurch, dass sie in der Längsrichtung der Peristommulde, also nach links rückwärts schlagen. Gleichzeitig wird aber auch noch eine Verminderung der translatorischen Kraftkomponenten der Ventralseite durch den Umstand verursacht, dass die Peristomalzilien ihre Tätigkeit in einer tiefen Grube ausüben, so dass ihr lokomotorischer Effekt schon aus diesem Grunde gering ist. Da nun das auf die besondere Tätigkeit der Peristomalzilien zurückführbare Übergewicht der dorsalen Wimperkräfte in erster Linie am Vorderende des Körpers zur Geltung gelangt, so kommt auf diese Weise die zuerst von *Alverdes* (1922a) beschriebene doppelspiralige Bewegung zustande.

Über diese normale Bewegungsform des *Paramecium* sowie über die Faktoren, die in ihrem Zustandekommen mitspielen, lässt sich mittels der mit

den Lebenduntersuchungen kombinierten Schnellfixierungsmethode folgendes feststellen.

Obschon in der unter der Linse des Mikroskops befindlichen Wasserprobe die überwiegende Mehrheit der Tiere in einer linksgewundenen Schraubenbahn vorwärts schwimmt, beträgt die Anzahl der mit rechtsgewundenen Zilienwellen erstarrten Infusorien in den mit dem Schnellfixierungsverfahren erhaltenen Präparaten — zweifellos infolge der mit der Fixation zusammenhängenden erwähnten Reizwirkungen — kaum 1%. Das Wellenmuster dieser spärlichen Individuen weist aber schon — in vollem Einklang mit den Lebendbeobachtungen — darauf hin, dass es verschiedene Varianten der linksgewundenen Bahnform gibt.

So fällt bei der aufmerksamen Untersuchung der Bewegungsbahn der frei herumschwimmenden Tiere vor allem auf, dass das *Paramecium* manchmal eine Bewegungsform ausführt, welche man sich nur durch gleichmässig auf dem ganzen Körper verteilte, gleich grosse Ruderkräfte erklären kann. Diese Bewegungsart setzt sich bloss aus einer reinen Translation und aus einer Rotation um die Längsachse zusammen, *entspricht also einer einfachen geradlinigen Bohrbewegung*. Nach ausdauerndem Suchen gelang es denn auch in den Präparaten Individuen zu finden, deren Zilienwellenmuster aller Wahrscheinlichkeit nach mit dieser Bewegungsform identifiziert werden kann.

Die nach rechts hinten schlagenden Wellenkämme bedecken den Körper dieser Tiere (Abb. 5 und 6) in einem Steigwinkel von ungefähr 45°, wobei der Abstand zwischen den Kämmen am ganzen Körper gleich gross ist. Das Verhältnis der translatorischen und rotatorischen Kraftkomponenten zueinander sowie die aus ihnen resultierende Triebkraft darf also demgemäss an jedem Körperteil als konstant angenommen werden und stellt überall den gleichen Wert dar. Die an lebenden Tieren beobachtete geradlinige Bohrbewegung kommt natürlich auch bei einer solchen Wellenanordnung nur dann zustande, wenn das Wimperkleid der Peristommulde vollwertig an der Lokomotion mitwirkt. An den erwähnten fixierten Exemplaren (Abb. 7) ist in der Tat ersichtlich, dass die Peristomalzilien in Wellenkämmen angeordnet sind, deren Verlauf und Verteilung mit den Wellen der Körperzilien übereinstimmt.

Die Existenz dieser Bewegungsform verdient von zwei Gesichtspunkten eine besondere Beachtung. Einerseits liefert sie einen Beweis dafür, dass auch bei gleichartiger Anordnung der Zilienwellen auf der ganzen Körperfläche eine Konstanz in der Achsenstellung erreicht werden, also eine regelmässige Bewegung entstehen kann, bei welcher die Körperlängsachse und die Bewegungsbahn zusammenfallen. Dies bedeutet mit anderen Worten, dass *morphologische und topographische Gegebenheiten*, (d. h. eine eventuell nicht völlig gleichmässige Verteilung der Körperzilien bzw. eine tiefere Lage der Ziliatur der Peristommulde) *keine Unregelmässigkeiten in der Bewegung des Tieres hervorrufen*. Die hauptsächlich in aboraler Richtung zu erwartenden Abschwenkungen werden anschei-

nend durch die grössere Dichte der Peristomziliatur (Doppelzilien!) vollständig kompensiert. Da aber während der Ausführung dieser einfachen Bohrbewegung auch die Peristomalzilien in der gleichen Richtung wie die Körperzilien, also aus der Mulde seitwärts nach aussen zu schlagen, ist es auch offenkundig, dass hierbei weder eine Nahrungszustrudelung gegen die Mundöffnung zu noch eine »Probeaufnahme« aus der Umgebung erfolgen kann. Diese Art der Ortsveränderung stellt also eine rein *lokomotorische Bewegungsform* dar. Bei einer Veränderung der Schlagrichtung und des Schlagrhythmus der Zilien, die am ganzen Körper im gleichen Sinne und in gleicher Stärke auftritt, kann indessen — bei Beibehaltung des Charakters der *Bohrbewegung* — insofern eine Veränderung eintreten, als sich dann nach den an den Präparaten gemachten Feststellungen die Fortbewegungsgeschwindigkeit sowie die Geschwindigkeit und die Richtung der Drehung um die Längsachse verändern.

Eine *schraubenförmige*, also eine Raumkurve beschreibende Bewegungsbahn kann im Sinne der theoretischen Betrachtungen *Ludwigs* dann aus der obenstehenden Bewegungsform entstehen, wenn an irgendeinem Teil der Körperfläche ein Überschuss oder eine Verminderung der Ruderkräfte eintritt. Die Richtung und Intensität des Zilienschlages kann sich in der Tat verändern u. zw. auch lokal an jeder Körpergegend. So kann denn auch bei gleichförmiger Wellenanordnung der Körper- und Peristomalzilien eine schraubenförmige Bewegungsbahn zustande kommen. Die Störung des Gleichgewichts der wirkenden Kräfte wird jedoch — entsprechend den Feststellungen *Jennings'* und hauptsächlich denen *Ludwigs* — in erster Linie auf die veränderte Schlagtätigkeit der Peristomalzilien zurückgeführt werden können.

Alle Anzeichen weisen nämlich darauf hin, dass die Zilien der Peristommulde in ihrer Gesamtheit in physiologischer Beziehung eine unterschiedliche Autonomie besitzen. Der besondere Charakter dieser Zilien dürfte wahrscheinlich mit ihrer doppelten physiologischen Rolle zusammenhängen. Ihre Tätigkeit bezweckt nämlich nicht nur die Ortsveränderung des Tieres, sondern ihre Aufgabe besteht in erster Linie — eventuell sogar auf Kosten der Fortbewegung — darin, die an die Peristommulde anstossenden Nahrungsteilchen gegen die Mundöffnung zu strudeln. Sie stellen daher wiederholt infolge von besonderen äusseren oder inneren Reizwirkungen ihre Tätigkeit plötzlich und auf längere Dauer in den Dienst der Nahrungszufuhr. Zu diesem Zwecke beginnen dann die Peristomalzilien in einem von den Körperwimpern unabhängigen Rhythmus gegen die Mundöffnung zu, also nach links rückwärts zu schlagen, wie dies auch aus Abb. 8 ersichtlich ist. Die rotatorische Komponente der durch sie ausgeübten motorischen Kraft nimmt also eine entgegengesetzte Richtung an und arbeitet gegensätzlich zur rotatorischen Komponente der auch weiterhin nach rechts hinten schlagenden Körperzilien, wodurch die durch die Körperzilien hervorgerufene Achsendrehung des Körpers in einem gewissen Grade gebremst wird. In der Verteilung der an der vorderen Körperhälfte angreifenden Tangentialkräfte tritt infolgedessen eine

Verschiebung, eine Asymmetrie auf Kosten der Ventralseite ein, wobei die neue Kräfteverteilung eine Veränderung der ursprünglichen Bewegungsform nach sich zieht: aus der einfachen, linksdrehenden Bohrbewegung wird eine schraubenförmige Bewegungsbahn entstehen (vgl. *Ludwig*, 1929). Das Vorderende des Tieres beschreibt dann eine linksgewundene Schraubenlinie, wobei die Bauchseite mit verminderter lokomotorischer Kraft ständig der Schraubenachse zugekehrt ist. Das Hinterende des Körpers bewegt sich demgegenüber auch weiterhin im grossen und ganzen längs einer Geraden vorwärts.

Diese linksgewundene »Spiralbewegung« ist bei Berücksichtigung der rechtsgewundenen Schraubengestalt des Tieres (vgl. S. 180) vom hydrodynamischen Standpunkt offensichtlich unnatürlich, weil sie einen beträchtlichen Mehraufwand an Kraft erfordert. Vom ernährungsmechanischen Gesichtspunkt liegt ihre Bedeutung dagegen auf der Hand. Bei dieser Bewegungsart hält das Tier die Peristommulde quer zu seiner Drehrichtung, so dass sie in ihrer ganzen Ausdehnung ständig mit immer neuen Wassermengen in Berührung kommt, die noch voller Nahrungsteilchen sind *(linksgewundene, nutritorische Bewegungsweise)*. Die vom Gesichtspunkt der gewöhnlichen Bewegungsform des *Paramecium* als widernatürlich anzusprechende rechtsgewundene Bohrergestalt selbst hat sich offenbar im Interesse der vagilen strudelnden Ernährungsweise ausgebildet. Es darf nämlich angenommen werden, dass der vor dem Mund befindliche Körperbezirk im Laufe der Stammesgeschichte — von jeher senkrecht zur gewöhnlichen Drehungsrichtung des Tieres — allmählich zu einer rechtsgewundenen, sich gegen die Mundöffnung zu vertiefenden Mulde eingesunken ist *(Párducz*, 1936), da die Aufgabe der Erfassung und Weiterleitung der Nahrung nur in dieser Form zufriedenstellend verrichtet werden kann.

Aus den Präparaten (Mikroaufnahmen) ist jedoch auch ersichtlich, dass das *Paramecium* seine besondere Kontrolle über die Peristomalzilien auch in einem weiteren Rahmen auszuüben vermag. So wurden an zahlreichen fixierten Tieren in der Peristommulde Wellen gefunden, deren Abstand grösser war als derjenige der Körperzilienwellen und auch solche, die im verschiedensten Steigwinkel verliefen. In selteneren Fällen kann es sogar zu einer Umdrehung ihrer Schlagrichtung kommen (Abb. 9). Dies ist wahrscheinlich dann der Fall, wenn sie als Nahrung ungeeignete Partikelchen oder unangenehme Reizstoffe aus der Mundgrube hinausbefördern. Jede solche Veränderung des Bewegungsrhythmus und der Schlagrichtung der Peristomalzilien wirkt sich natürlich auch auf den Charakter der jeweiligen Schraubenbahn aus, indem deren Durchmesser bald kleiner und bald grösser wird.

Die entlang einer linksgewundenen Schraubenlinie erfolgende Fortbewegung, die in der Fachliteratur auf Grund der Feststellungen von *Jennings* als die unter konstanten Bedingungen vor sich gehende, normale Bewegungsform des *Paramecium* angesehen wird, *stellt also eigentlich bereits eine sekundäre Bewegungsweise dar*, die aus der geradlinigen Bohrbewegung abgeleitet werden

kann. Es kann des weiteren auch festgestellt werden, dass die Entstehung der typischen Schraubenbahn nicht mit dem von vornherein vorhandenen Übergewicht der dorsalen Wimperkräfte *(Ludwig)* und noch weniger mit der energischeren Schlagtätigkeit der Peristomalzilien im Vergleich zu derjenigen der Körperzilien *(Jennings)* in Verbindung steht. Die Wahrheit ist, dass das Tier in der Mulde den Rhythmus und die Richtung der Zilienschläge unabhängig von den Körperzilien zu regulieren imstande ist und dass es diese Regulation auch ständig ausführt. Der jeweilige Charakter der Fortbewegungsbahn wird also durch die jeweilige Tätigkeit der Peristomalzilien, in der Regel durch die eine Verminderung bedeutende Veränderung des lokomotorischen Effekts dieser Zilien bestimmt. Aus der Tatsache, dass der Abstand der Peristomalwellen voneinander im allgemeinen grösser ist als derjenige der Wellenkämme des Körpers, folgt jedoch, dass die Peristomalzilien auch in diesem Falle keine gegen den Mundeingang zu gerichtete Wasserströmung in der Umgebung zu erzeugen vermögen. Ihre Rolle beschränkt sich lediglich auf die Weiterbeförderung der von der Mulde aufgefangenen Nahrungsteilchen gegen die Mundöffnung zu.

An den lebenden Tieren lässt sich deutlich feststellen, dass die Ganghöhe der Schraubenbahn zwischen weiten Grenzen variieren kann. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung können auch auf der Körperfläche der fixierten Tiere — neben den in einem Winkel von 45° steigenden Zilienwellen — Wellenkämme von verschiedenster Schlagrichtung angetroffen werden. Von den fast längsgerichteten (bei langsam vorwärtsschwimmenden, schnell rotierenden Tieren) bis zu quergerichteten (bei sich rein translatorisch fortbewegenden Tieren) Wellen lassen sich sämtliche Übergangsfälle der Zilienanordnungen beobachten. Ausserdem können aber auch die einzelnen, synchron tätigen Zilienreihen — unabhängig von ihrem Verlauf — durch grössere oder kleinere Abstände voneinander getrennt sein (Abb. 10—12). Dementsprechend schwankt die Anzahl der auf einem Individuum feststellbaren Wellenkämme im allgemeinen zwischen 6 und 18. Bei Tieren von gleicher Körpergrösse bedeutet eine Zusammenschiebung der Wellen offensichtlich, dass ein und dieselbe Zilie infolge der Verkürzung der regressiven Phase in derselben Zeit mehrere Male in die aktive Schlagstellung gelangt. Mit anderen Worten, dass die Anzahl der die eigentliche lokomotorische Kraftwirkung erzeugenden Phasen bedeutend zunimmt. Von den in den Präparaten befindlichen gleich grossen Individuen mit dichteren oder selteneren Zilienwellen kann demnach angenommen werden, dass sie *während einer schnelleren bzw. langsameren Fortbewegung erstarrt sind.* Die Grösse der Geschwindigkeitserhöhung, die mit diesem einfachen Mechanismus, d. h. mit der Vermehrung der Wellenzahl und mit deren gesteigerter Fortpflanzungsgeschwindigkeit erreicht werden kann, wird durch zwei an lebenden Tieren festgestellte Angaben veranschaulicht. Bei einer durchschnittlichen Körperlänge von 200 μ beträgt bei normaler, linksgeschraubter Bahn

die Fortbewegungsgeschwindigkeit ungefähr 1300 μ/sec. Die Höchstgeschwindigkeit, die das Tier zu erreichen vermag, ist demgegenüber nahezu dreimal so gross, nämlich etwa 3500 μ/sec. Im ersten Fall ist also das *Paramecium* imstande, in einer Sekunde etwa das Sechsfache, im zweiten Fall dagegen mehr als das 17fache seiner Körperlänge zurückzulegen.

2. *Vorwärtsbewegung in rechtsgewundener Schraubenbahn*

Obwohl die Schlagebene jeder einzelnen Zilie des *Paramecium* sozusagen auf einen beliebigen Winkel eingestellt werden kann *(Párducz*, 1953, Abb. 21), lassen sich immerhin einige Schlagrichtungen feststellen, welche unter gewissen Bedingungen von den Zilien bevorzugt werden. So dominiert — wie gezeigt wurde — in erster Linie der nach rechts hinten gerichtete Wirkungsschlag, welcher die vom Infusor gewöhnlich eingeschlagene linksgewundene Bewegungsform hervorruft. Eine andere häufige Schlagrichtung der Körperzilien ist die nach links hinten gerichtete (wie bei den Peristomalzilien während der Einstrudelung der Nahrung). Diese Richtung bedeutet also eine Abweichung um 90° im Vergleich zur normalen Schlagebene. In diesem Falle schwimmt das Tier in einer rechtsgewundenen Schraubenbahn nach vorne. Bei der überwiegenden Zahl der fixierten Individuen (im Durchschnitt bei 90%) finden sich dieser Fortbewegungsweise entsprechende, also linksgewundene Wellenkämme (Abb. 13—27). Den Anzeichen nach setzt bei Tieren, die sich in einer starken Strömung stromaufwärts eingestellt haben, eine derartige Umschaltung der Drehungsrichtung ein, während die völlige Umkehr des Windungssinns in einem stark eingedickten Medium — wie dies bereits durch *Alverdes* (1923) und neuerdings auch durch *Ludwig* (1951) festgestellt wurde — regelmässig einzutreten pflegt.

In einer früheren Mitteilung versuchte der Verfasser *(Párducz*, 1952b) bei Berücksichtigung dieser Beobachtungen sowie der rechtsgewundenen Bohrergestalt des Tieres eine Erklärung für das Auftreten der grossen Anzahl von inversen Wellenmustern in den Präparaten zu geben. Er gelangte damals zur Folgerung, dass auch während der technischen Ausführung des Fixierungsverfahrens wahrscheinlich die verhältnismässige Zunahme des Mediumwiderstandes jener Faktor sein dürfte, welcher die gegen die entstehenden Wasserströmungen ankämpfenden Tiere in eine der Schraubenform des Körpers entsprechende Bewegungsbahn zwingt. Die rechtsgewundene Drehungsrichtung entspricht nämlich — wie schon von *Ludwig* (1929) gezeigt wurde — der Krümmung der Peristommulde und ist somit vom hydrodynamischen Gesichtspunkt für das *Paramecium* optimal. Dass gerade die eigentümliche Bohrergestalt des Tieres bei der Auslösung dieser Bewegungsform die Hauptrolle spielen dürfte, erscheint u. a. durch die Erfahrung bewiesen, dass die Drehungs-

inversion bei Tieren, die mit gewissen Narkotika behandelt wurden und deren Zilienschlag infolgedessen wesentlich schwächer bzw. unregelmässiger war, gleichfalls regelmässig eintritt. Im Sinne der oben gegebenen Erklärung ist dies einfach deshalb der Fall, weil die bereits abgeschwächte lokomotorische Triebkraft nicht mehr imstande ist, das Tier in der zur Körperwindung entgegengesetzten Drehrichtung zu halten.

Die seit dem Erscheinen der erwähnten Arbeit durchgeführten Beobachtungen und Versuche liessen aber im Verfasser die Überzeugung aufkommen, dass das mit der Anwendung des Schnellfixierungsverfahrens verbundene häufige Auftreten des Drehungswechsels noch keineswegs als geklärt angesehen werden darf. Es ist sogar möglich, dass diese Erscheinung mit der auch im eingedickten Medium eintretenden Drehungsinversion nicht das Geringste zu tun hat, bzw. höchstens indirekt mit ihr zusammenhängt. In letzter Zeit fand nämlich der Verfasser beim Experimentieren mit quer entzweigeschnittenen Tieren zwei isolierte Hinterteile, an denen — wider aller Erwartung — der Verlauf der Zilienwellen *gleichfalls linksgewunden war.* Die Drehungsinversion trat also auch an diesen verstümmelten Exemplaren ein, obzwar hier die durch die Einbuchtung der Peristommulde verursachte Steuerwirkung wegfällt. Vorläufig hat es demnach den Anschein, als ob auch die an den unversehrten Tieren in den Präparaten sichtbaren Inversionen durch einen auf die Zilien ausgeübten unmittelbaren Funktionsreiz hervorgerufen werden. Dies dürfte im Zusammenhang mit jener fast »reflexartigen« Eigenschaft der Zilien stehen, dass sie bei gewissen Reizwirkungen ihre Schlagrichtung um einen bestimmten Winkel abändern. Dieses Bestreben der Zilien, die Ebene des Hinschlages im besprochenen Falle *um eben 90 Grad* zu verschieben, lässt sich aber auch weiterhin wohl kaum ohne Berücksichtigung der eigentümlichen Bohrergestalt des Ziliatenkörpers erklären. Es kann sich hier vielleicht um eine sich lange Zeit hindurch ausgebildete physiologische Anpassung der Zilien handeln, die durch einen der normalen Drehrichtung entgegengesetzten Torsionssinn des Körpers notwendig wurde. Natürlich ist dies nur eine Annahme, die einer Bestätigung durch weitere Versuche bedarf.

Ähnlicherweise ist auch die viel umstrittene Frage des in einem natürlichen Milieu auftretenden Drehungswechsels erst durch weitere eingehende Untersuchungen endgültig zu klären. In der Literatur kehrt nämlich die Behauptung immer wieder, dass sich der links- und rechtsgewundene Drehungssinn beim *Paramecium* ständig abwechseln. Vor kurzem bekräftigte *Ludwig* (1951) auf Grund von Beobachtungen an einem gewaltigen Material von neuem diese wiederholt zurückgezogenen Wahrnehmungen verschiedener Autoren. Nach seinen Feststellungen ist die Häufigkeit der Links- bzw. Rechtsdrehungen ungefähr gleich gross.

Die Wahrscheinlichkeit spricht tatsächlich dafür, dass das Tier gelegentlich zu dieser hydrodynamisch günstigeren Form der Fortbewegung übergeht, die

durch die technisch leicht ausführbare Umstellung der Schlagrichtung der Zilien sowie durch die rechtsgewundene Bohrergestalt des Körpers gewährleistet wird. Es steht auch fest, dass eine völlig zuverlässige Feststellung des Eintritts der Drehungsinversion unter gewissen Bedingungen, z. B. während des Vorwärtsschnellens des Tieres, keine leichte Aufgabe darstellt. Der Beobachter hat neben starker Vergrösserung gleichzeitig auch für ein möglichst grosses Sehfeld und eine grosse Schärfentiefe Sorge zu tragen. Dabei erliegt selbst ein geübter Beobachter sehr leicht der Täuschung, dass er wegen der schraubenförmigen, also in vertikaler Projektion wellenlinienmässig steigenden und fallenden Bewegung des Tieres nach der Registrierung des Drehungssinns der oberen, ihm zu gerichteten Körperfläche die Bewegung der unteren, also im entgegengesetzten Sinn rotierenden Körperfläche als Drehungsinversion qualifiziert. Eben zur Ausschaltung der optischen Täuschungen wurde der Drehungssinn des *Paramecium* vom Verfasser bei bester stereoskopischer Optik und im Dunkelfeld untersucht. Das Ergebnis blieb aber unverändert: ohne künstlichen Eingriff wurde in den zu den Untersuchungen verwendeten Beständen bisher kein einziges Individuum angetroffen, an dem ein Drehungswechsel hätte beobachtet werden können. Die rechtsgewundene Bewegungsform muss demnach vorläufig *als ein ausgesprochenes Laboratoriumsprodukt angesehen werden.* Dieser Umstand möge bei der nun folgenden Beschreibung der entsprechenden Zilienwellenmuster stets vor Augen gehalten werden.

Die durch die Wellen gebildeten Schraubengewinde verlaufen auch hier am häufigsten in einem Steigwinkel von 45° um den Körper. Sie geben also ein getreues Spiegelbild der Wellenmuster des normalerweise sich nach rechts schraubenden Tieres. Die Anordnung der Wellenkämme ist in diesem Falle recht regelmässig: sie verlaufen parallel und folgen in ziemlich gleichen Abständen aufeinander (Abb. 13—15). So ist denn die Schlagrichtung der einzelnen Zilien zur Körperachse sowie das Verhältnis der Dauer des Hin- bzw. Rückschlages in jeder Körpergegend gleichförmig und konstant. Diese Eigenschaften der Zilienwellen weisen somit auf eine gleichmässige, wohlbestimmte Fortbewegungsart hin. Aus der Tatsache, dass sich die inversen Wellen über die ganze Körperfläche ausbreiten, darf dann der Schluss gezogen werden, dass dieses Zilienmuster nicht einer kurzen Bewegungsreaktion des Tieres entspricht, sondern die Bewegungsstellungen der Zilien während einer verhältnismässig lang dauernden Lokomotionsart festhält. Die linksgewundenen Wellenkämme werden — wenn man sie mit den für die normale Bewegung charakteristischen Zilienwellen vergleicht — im allgemeinen durch kleinere Abstände voneinander getrennt. Die lokomotorische Kraftleistung der Gesamtziliatur ist hier also offensichtlich grösser, was unter gleichen Bedingungen eine schnellere Bewegung ermöglicht.

Aus der Anordnung der Zilienwellen kann auch festgestellt werden, dass die entsprechende Schraubenbahn aller Wahrscheinlichkeit nach eng ist. Auf den

Abbildungen 16—21, welche die Tiere in Ventralansicht zeigen, weisen nämlich die Zilienwellen der Mulde denselben Steigwinkel auf wie die Körperzilien, wobei der aktive Zilienschlag hier wie dort nach links hinten erfolgt. In diesem Falle nehmen also auch die Peristomalzilien am Vorwärtstreiben des Körpers teil. Die metachronischen Zilienwellen der Peristommulde bilden aber nur in den seltensten Fällen eine unmittelbare und gerade Fortsetzung der Körperzilienwellen, wie dies z. B. aus Abb. 16 ersichtlich ist (*einfache, geradlinige und rechtsdrehende Bohrbewegung*, bei welcher Tierlängsachse und Bewegungsbahn zusammenfallen). Anstatt dessen bedeutet die vor dem Mund befindliche Nahtlinie in der Regel einen scharfen Grenzstrich zwischen der Verteilung der Zilienwellen der beiden Körperteile, u. zw. derweise, dass die Peristomalzilien im Vergleich zu den Körperzilien mit einer gewissen Phasenverschiebung schlagen. In den selteneren Fällen rührt diese Phasenverschiebung davon her, dass die Wellenfronten der Mulde durch grössere Abstände voneinander getrennt sind (d. h. dass sie in einem langsameren Rhythmus schlagen). Die translatorischen Komponenten sind also in diesem Falle am Vorderteil der Ventralseite kleiner als an der entgegengesetzten Seite. Die offenbare Folge dieser asymmetrischen Verteilung der Wimperkräfte ist nun, dass die geradlinige Bohrbewegung in eine der nutritorischen Bewegungsform ähnliche, doch rechtsgewundene Schraubenbahn mit kürzerem Radius übergeht, während die Bauchseite mit verminderter Kraftleistung auch hier ständig der Schraubenachse zugekehrt ist. Es tritt indessen auch häufig der Fall ein, dass die Peristomalzilien in einem etwas rascheren Rhythmus schlagen als die Körperzilien. Mit anderen Worten, auch bei dieser Variante der rechtsgewundenen Bewegung kann in der Peristommulde eine gewisse Strudelung gegen die Mundöffnung zu entstehen, die aber in diesem Falle durch die diastatische Stellung der Mulde nicht unterstützt wird.

Vergleicht man nun die rechtsschraubige Fortbewegung mit der im gleichen Sinne gewundenen Bohrergestalt des Tieres, so könnte man glauben, dass zumindest in diesem Falle eine gewisse Stabilisierung der Bewegungsbahn zustande kommt. Die Präparate liefern hingegen den Beweis, dass die zweierlei Bewegungen auch in jener Hinsicht Spiegelbilder voneinander sind, dass dieselben, doch entgegengesetzt gerichteten Varianten der rechtsschraubigen Bahn auftreten können, wie sie bei der linksgewundenen Schraubenbahn besprochen wurden. Bei der Untersuchung einer grösseren Anzahl von Individuen, erhält man auch hier in bezug auf den Steigwinkel und die Wellendichte alle erdenklichen Übergänge zwischen den beiden Extremformen (Abb. 22—26).

3. Das Abbiegen der schraubenförmigen Bewegungsbahn (Bogenschwimmen mit Rotation)

In den Präparaten kann man noch weitere Varianten der links- sowie auch der rechtsgewundenen Fortbewegung bzw. die Erklärung für diese erhalten.

Diese Varianten können auch an den lebenden Tieren beobachtet werden und treten meistens in kleineren Unregelmässigkeiten der Bewegungsbahn zutage. Man sieht nämlich häufig Bilder, wo der Verlauf und die Dichte der Wellenkämme in verschiedenen Körperpartien nicht mit dem Wellenmuster identisch sind, das auf dem übrigen, grösseren Teil des Körpers herrscht. Einige Beispiele für diese ungleichmässige Wellenverteilung werden in Abb. 28—36 gezeigt. *Selbst innerhalb eines begrenzten Zilienbezirkes kann sich also die Richtung und der Rhythmus des Zilienschlages ändern.* Es ist offenbar, dass eine jede solche lokale Veränderung der Zilientätigkeit eine weitere Verschiebung des Verhältnisses zwischen den translatorischen und rotatorischen Kraftkomponenten zur Folge hat, was letztlich eine grössere oder kleinere Verzerrung der sonst regelmässigen Schraubenbahn hervorrufen muss.

Eine interessante Variante hiervon dürfte wahrscheinlich auch jene, bereits von *Alverdes* (1922/b) und nach ihm von mehreren Forschern untersuchte Bewegungsform darstellen, bei welcher das Tier unter Beibehaltung seiner Drehung um die Längsachse der Reizquelle in einem regelrechten Bogen ausweicht. Die sonst pfeilgerade Achse der Bewegungsbahn biegt sich in diesem Falle also aus.

Die mit dem Schnellfixierungsverfahren erhaltenen Bilder scheinen die einfache und überzeugende Erklärung von *Bozler* (1926) über die Entstehung dieser eigentümlichen Bewegungsform zu bestätigen. An diesen Exemplaren sind nämlich an Stelle der sonst in den Präparaten dominierenden, regelmässigen Wellenanordnung hier an der einen Seite des Körpers bzw. an einem grösseren oder kleineren Bezirk der Körperfläche die Zilienwellen näher zueinander gelegen. Die Verminderung des Abstandes zwischen den synchron ausschlagenden Zilienreihen bedeutet jedoch wahrscheinlich — wie aus dem Vorstehenden ersichtlich —, dass die Zilien am lebenden Tiere in einem schnelleren Rhythmus schlagen. Da aber die Zilienwellen auf der ganzen Körperoberfläche im allgemeinen links- bzw. rechtsgewunden bleiben, darf angenommen werden, dass das betreffende *Paramecium* im Augenblick der Fixierung bei Beibehaltung der Schraubenbahn gerade einen Bogen beschrieb, u. zw. derweise, dass die Körpergegend mit den dichteren Zilienwellen gegen die konvexe Seite des Bogens zu gelegen war. Die Vorbedingung hierfür besteht nur darin (*Bozler*, 1926), dass sich die Beschleunigung der Zilienbewegung trotz der Achsendrehung des Körpers bloss auf die jeweils der Reizquelle zu gelegene Gegend der Körperfläche beschränke. Dies stösst auf keinerlei Schwierigkeiten, da ja bekannt ist, wie schnell die verändert schlagenden Zilien nach Aufhören der Reizung wieder ihre frühere, normale Tätigkeit aufnehmen können. Während der Drehung des Tieres um seine Längsachse wird so der Schlagrhythmus ringsherum in immer neuen Zilienbezirken der Körperoberfläche beschleunigt. Nimmt man z. B. an, dass die intensivere Tätigkeit des Wimperkleides durch eine von der Seite her kommende unangenehmere Reizwirkung ausgelöst wurde,

so ist das Tier mit Hilfe dieses einfachen Mechanismus imstande, während seiner schraubenförmigen Bewegung der Reizquelle im Bogen auszuweichen. Auf Grund der bisher in den Präparaten erhaltenen Exemplare ist der Schluss zulässig, dass diese einfache Art des Ausweichens vor unangenehmen Reizwirkungen in mehreren Varianten und Abstufungen vorkommt und sogar bei der später zu behandelnden Rückwärtsbewegung vorhanden ist.

4. Translatorische Bewegung ohne Rotation

In den Präparaten sind jene Exemplare recht häufig, bei denen der Steigwinkel der Zilienwellen nur wenig von Null abweicht, während die völlig quer verlaufenden Wellenkämme bereits viel seltener anzutreffen sind. Der wirksame Zilienschlag richtet sich in diesem Falle rein nach hinten und hat ein verhältnismässig rasches Vorwärtsschwimmen ohne Rotation zur Folge. Diese Bewegungsform wird vor allem dort beobachtet, wo es gilt, gegen einen grösseren Mediumwiderstand anzukämpfen. So kann man eine solche Bewegungsart z. B. bei Tieren feststellen, die in einer Wasserströmung stromaufwärts schwimmen. In diesem Falle versucht das *Paramecium* eine Zeit lang — bei einer gewissen Strömungsgeschwindigkeit — sein Fortgeschwemmtwerden durch eine rein translatorische Bewegung zu verhindern, um dann bei Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit eventuell in die hydrodynamisch optimale, rechtsschraubige Bewegungsform überzugehen. Doch auch in den auf den Objektträger befindlichen freien Wassertropfen, hauptsächlich jedoch unter dem Deckglas kann dieses kürzere oder längere rotationsfreie Weiterschwimmen der Tiere häufig beobachtet werden. Im letzteren Falle dürfte die infolge der Verdunstung des Wassers immer dünner werdende Wasserschicht wahrscheinlich nicht mehr genügend Raum für eine Schraubenbahn gewährleisten. Die Verschiebung der Zilienschlagrichtung in die sagittale Ebene ist übrigens von zwei Gesichtspunkten für das Tier vorteilhaft. Einerseits kommt die bei der gegebenen Körperform hydrodynamisch unvorteilhafte, einen grösseren Kraftaufwand beanspruchende linksgewundene Drehrichtung in Fortfall. Andererseits verstärkt dann auch die zur Drehung des Körpers verwendete rotatorische Kraftkomponente des Zilienschlages nunmehr die der Längsachse entlang wirkende Komponente, so dass die von den Zilien geleistete Arbeit fast zur Gänze im Dienst der Vorwärtsbewegung steht.

Je nachdem, in welchem Ausmass die Schlagrichtung der ursprünglich nach rechts hinten schlagenden Zilien allmählich in die kaudale Richtung übergeht und sich eventuell noch weiter nach links verschiebt, beobachtet man auch in den Präparaten einen allmählichen Übergang zwischen den sich sanft nach rechts schraubenden und fast auf der ganzen Körperfläche quer verlaufenden Wellenkämmen einerseits und den sanft nach links gewundenen andererseits

(Abb. 37—39). Die senkrecht zur Längsachse angeordneten Zilienwellen bilden kein Schraubengewinde mehr, sondern umgeben den Körper in mehr oder weniger regelmässigen, zu sich selbst zurückkehrenden Ringen. Leider konnte bisher in den Präparaten noch kein einziges Individuum gefunden werden, das mit seiner Bauchseite nach oben gerichtet war, an dem also bei quergerichtetem Körper auch die Schlagrichtung der Peristomalziliatur hätte festgestellt werden können. Im Falle rotationsloser Fortbewegung müsste nämlich — gemäss den Überlegungen *Ludwigs* — der von vornherein bestehende Unterschied zwischen den Wimperkräften der Bauch- und Rückenseite zur Geltung kommen. Dieser Unterschied würde sich derweise auswirken, dass sich das Tier in einem Kreise — mit der Peristommulde nach innen — bewegt, bzw. die Bewegung in einem Bogen erfolgt, wobei sich das Mundfeld ebenfalls an der konkaven Seite des Bogens befindet. Nun vermögen aber die Tiere — was besonders bei sich der Wasserströmung entgegenstemmenden Exemplaren beobachtet werden kann — ihre Achsenstellung eine recht lange Zeit ohne Ausschwenkung zu bewahren. Diese Erscheinung weist ebenso wie die Existenz einer geradlinigen Bohrbewegung (Schraubenbahn mit einem Grundradius Null) darauf hin, dass während der Ausübung dieser Bewegungsform in der Verteilung der motorischen Kraft des Wimperkleides kein wesentlicher Unterschied zwischen der Bauch- und Rückenseite des *Paramecium* besteht. Im entgegengesetzten Falle müsste nämlich ein besonderer Regulationsmechanismus vorhanden sein, der die auf den morphologischen Eigenschaften beruhenden Triebkraftunterschiede durch entsprechende Beeinflussung des entgegengesetzten Zilienbezirkes völlig zu kompensieren imstande wäre.

5. *Rückwärtsbewegung in einer Rechtsschraube*

Die Rückwärtsbewegung in einer rechtsgewundenen Schraubenbahn ist eine Bewegungsreaktion des *Paramecium*, die bei unangenehmen chemischen Reizen erfolgt und auch experimentell leicht hervorgerufen werden kann. Die Rückwärtsbewegung kann auf einer Strecke erfolgen, die nur einen Bruchteil der Körperlänge beträgt, aber auch wesentlich länger, bis zu mehreren cm lang sein kann, wobei die durchlaufende Bahn in der Regel mit dem letzten Abschnitt der vorhergehenden, normalen Bewegungsbahn zusammenfällt. Gleichzeitig führt das Tier eine verhältnismässig schnelle Drehbewegung um seine Längsachse aus. Die durch den Körper beschriebene Bewegungsbahn stellt eine interessante Abart der schraubenförmigen Bewegung dar. Die Längsachse des Tieres kann völlig mit der Schraubenachse zusammenfallen, oder aber beschreibt das vordere, vom Gesichtspunkt der Fortbewegung jetzt nach hinten blickende Körperende während der Bewegung eine Schraubenlinie. Im letzteren Falle bewegt sich also der hintere Pol unverändert längs einer

Geraden. Der Durchmesser der durch das vordere Körperende beschriebenen Schraubengänge ist eine Zeitlang konstant, in der Endphase des Zurückschwimmens tritt indessen gewöhnlich eine allmähliche Erweiterung dieses Rotationstrichters ein.

Dieser Umstand, sowie die Tatsache, dass das Zurückschwimmen auch bei einfacher Rotation, also ohne jegliche Ausbiegung des vorderen Körperendes möglich ist, weist gleicherweise darauf hin, dass die Seitenabweichungen nicht durch die Unregelmässigkeiten der Körpergestalt sondern durch eine einseitige Veränderung der Schlagweise der vorderen zirkumpolaren Ziliatur verursacht wird. Die Rückwärtsbewegung erfolgt ausnahmslos in einer rechtsgewundenen Schraubenbahn, d. h. dass der aktive Zilienschlag am Körper notwendigerweise nach rechts vorwärts gerichtet sein muss. Infolge der auffallend schnellen Rotation um die Längsachse kann der Winkel zwischen der aktiven Schlagrichtung der Zilien und der Längsachse des Tieres nur um weniges geringer sein als 90°. Die Wellenkämme können demgemäss fast in der Längsrichtung, etwas nach links gewunden verlaufen.

Das Wellenmuster der während des Zurückschwimmens fixierten Tiere entspricht vollständig den Eigenschaften der Bewegungsbahn, die aus lebenden Tieren herausgelesen wurden. Tatsächlich wurden am Körper der fixierten Tiere nur steil rechtsgewundene und nach links, etwas nach rückwärts ausschlagende Wellenkämme angetroffen (Abb. 40—43). Die geringe Anzahl der in den Präparaten bisher gefundenen rückwärtsschwimmenden Individuen reicht indessen nicht aus, um die Entstehung der vom vorderen Körperende zeitweilig beschriebenen Schraubengänge von verschiedenem Durchmesser hinreichend erklären zu können.

6. Rotation an Ort und Stelle

Falls das *Paramecium* mit Hilfe des Zurückschwimmens in einen Wasserraum gelangt, in dem die störenden Reize nicht wirken, so kehrt es entweder unmittelbar durch eine Veränderung der Schlagebene der Zilien oder nach Einschaltung einiger Kegelschwingungen, oder aber durch eine einfache Umkehrung seiner Körperachse wieder zur normalen linksgewundenen Bewegung zurück. Wenn aber die für den Organismus schädliche Reizwirkung andauert und stark ist, wird die Rückwärtsbewegung allmählich langsamer und geht in eine schnelle, gleichmässige Rotation um die Körperachse über. Dieses Rotieren an Ort und Stelle kann je nach der Stärke der Reizwirkung eine kürzere oder längere Zeit dauern, wird aber schliesslich langsamer und häufig auch ungleichmässig. Endlich hört die koordinierte Zilientätigkeit überhaupt auf, wobei das Tier unter unregelmässigem Hin- und Herschlagen der Zilien zu Boden sinkt und bald darauf zugrunde geht. Die dieser Bewegungsform entsprechende Wellenanordnung ist häufig auch in den Präparaten sichtbar (Abb. 44—47).

An diesen Individuen sind die Wellenkämme in der Längsrichtung des Körpers im grossen und ganzen parallel zueinander angeordnet, die Zilien schlagen also an der ganzen Körperoberfläche rein tangential. Manchmal verlaufen die Wellen etwas schräg bzw. biegen sich an ihren Enden leicht nach rechts oder links, je nachdem ob sich das Tier gleichzeitig auch langsam fortbewegte, oder aber ob ein früheres Stadium des Überganges von der Rückwärtsbewegung zur Rotation fixiert wurde. An den beobachteten lebenden Tieren geht die Rotation im allgemeinen nach links, vom hinteren Körperende aus gesehen in entgegengesetztem Sinn zum Gang des Uhrzeigers vor sich. Sie entspricht demnach dem Windungssinn der normalen Fortbewegung und des Rückwärtsschwimmens. Desto auffallender ist es daher, dass an einigen fixierten Individuen ausschliesslich nach links ausschlagende Längswellen gefunden werden konnten (Abb. 47). Diese Tiere bestätigen also die Beobachtungen *Ludwigs*, wonach sich die Schlagrichtung der Zilien während der Rotation um 180° ändern kann und unter gewissen Bedingungen die Umdrehungen nach links mit solchen nach rechts abwechseln können.

An einigen Exemplaren sind die rings um den Körper angeordneten Längskämme nicht gleichmässig über die Körperfläche verteilt. Ein andermal findet man als erstes Zeichen der Auflösung der Koordination unter den Zilien im grossen und ganzen in der Längsrichtung verlaufende, doch nicht parallele, sondern miteinander anastomisierende und fleckenweise in verschiedene Richtungen ausschlagende Wellenmuster. Den ersteren Bildern entspricht eine Rotation um eine von der Körperlängsachse verschiedene, zu ihr parallele Gerade (Fall 4 bei *Ludwig*, 1929), den letzteren dagegen eine Rotation um eine schwankende Längsachse.

7. *Bewegung in einem Kegelmantel*

Eine häufige Bewegungsform des *Paramecium*, die eine längere oder kürzere Zeit dauern kann, besteht darin, dass das vordere Körperende des Tieres um seinen hinteren Pol als Mittelpunkt Kreise von verschieden grossem Durchmesser beschreibt. Zur Entstehung dieser Bewegung ist nach dem Schema *Ludwigs* eine derartige asymmetrische Verteilung der Wimperkräfte notwendig, dass die translatorische Resultierende Null ist, während die rotatorischen Kraftkomponenten rings um das Vorderende differieren. Häufiger ist jedoch jene Abart der Kegelschwingung, bei der sich das Hinterende gleichzeitig längs einer Geraden langsam vorwärts oder rückwärts bewegt.

Aus den fixierten und gefärbten Präparaten geht hervor, dass diese in ihrer äusseren Erscheinung stets identisch scheinende, charakteristische Bewegungsform auf mehrere, gänzlich verschiedene Arten zustande kommen kann. Der Auslösungsmechanismus besteht aber trotzdem meistens darin, dass die

Körperzilien im Vergleich zur »konservativeren« Schlagweise der Peristomalzilien die Richtung bzw. die Intensität ihres Schlages verändern.

a) Bei der nutritorischen Variante der linksgewundenen Bewegung handelt es sich eigentlich — wie bereits gezeigt wurde — schon um eine Trichterbewegung mit kleinerem Durchmesser, da die Bewegungsbahn des hinteren Körperendes in der Regel nicht einer Schraubenlinie (»Doppelspirale«), sondern einer Geraden entspricht. Falls sich nun die Bremswirkung der Peristomalzilien auf die Linksdrehung des Körpers steigert, oder genauer gesagt, wenn die rotatorische Kraftkomponente der Körperzilien im Vergleich zu derjenigen der Peristomalzilien schwächer wird, dann wird die Vorwärtsbewegung und die Rotation um die Längsachse langsamer, wobei sich der vom Vorderende gebildete Rotationstrichter proportional erweitert. Die Mulde ist auch in diesem Fall unverändert nach innen gekehrt, weil die Tätigkeit der Peristomalzilien die nach links rotierende Bewegung des Körpers nur bremsen kann. Wenn die Körperzilien gänzlich zu schlagen aufhören, so kommt eine in einer Ebene vor sich gehende kreisende Bewegung um den hinteren Pol zustande.

b) Falls die Peristomalzilien während einer rechtsdrehenden Bohrbewegung auf einen schnelleren Rhythmus übergehen als die Körperzilien (Abb. 18 und 20), dann kann ebenfalls eine Trichterdrehung des vorderen Körperendes zustande kommen, wobei aber das Tier wahrscheinlich mit der Ventralseite nach aussen gekehrt sein wird.

c) Wie gezeigt wurde, kann auch beim Rückwärtsschwimmen vom Vorderende eine Kegelschwingung ausgeführt werden. Aus verschiedenen Anzeichen lässt sich der Schluss ziehen, dass zumindest die anfängliche Erscheinungsform dieser Trichterbewegung, bei welcher der Durchmesser unverändert bleibt, in irgendeiner Weise mit der Tätigkeit der Peristomalzilien (oder vielleicht gerade mit ihrer Untätigkeit) zusammenhängt. Es gelang aber bisher noch nicht, den hier wirksamen Auslösungsmechanismus klarzustellen, ebensowenig wie bei jener Trichterbewegung (im Endabschnitt des Zurückschwimmens), bei welcher der Durchmesser ständig zunimmt.

In den bisher analysierten Fällen war es grösstenteils die Peristomziliatur, welche die im Vergleich zum normalen Zustand unverändert gerichtete Schlagkraft vertrat. Dieselbe Bewegungsform kann aber auch derweise entstehen, dass sich die Schlagrichtung der Peristomalzilien ändert, wobei gleichzeitig auch ihre Tätigkeit energischer wird. Die Körperzilien hören in einem solchen Fall entweder zu schlagen auf oder tun es nur mit geringerer Intensität.

Solche besondere, wahrscheinlich durch energische Reizwirkungen hervorgerufene Bewegungen werden durch die folgenden Bilder veranschaulicht.

d) In Abb. 9 ist zu sehen, dass die Körperzilien koordiniert nach rechts hinten, also normal ausschlagen, während die Peristomalzilien aus dem Inneren der Mundgrube nach aussen, also nach rechts vorne schwingen. Die rotatorische

Kraftkomponente der Körperzilien wird also durch die am vorderen Teil der Bauchseite in entgegengesetzter Richtung wirkende Tangentialkraft gebremst, wodurch wahrscheinlich eine Erweiterung des vom vorderen Körperende gebildeten Rotationskegels hervorgerufen wird.

e) In den Abbildungen 48—50 sind die Körperzilien im allgemeinen nicht in metachronischen Wellen angeordnet, bzw. wenn man am Körper (meistens rechtsgewundene) Wellenkämme überhaupt beobachten kann, so sind diese blass und verschwommen. Um so kräftiger sind jedoch die Wellen, welche an der vorderen Körperhälfte, u. zw. im Mundfeld auftreten. Ihr Verlauf ist parallel der Längsachse der Mulde, während ihre Schlagtätigkeit seitwärts nach rechts erfolgt.

Wenn man nun auf diesen Bildern die auf dem Protistenkörper im Moment der Erstarrung einwirkenden Wimperkräfte analysiert, so kann folgendes festgestellt werden. Die translatorischen Komponenten der Bewegung fehlen im allgemeinen gänzlich bzw. stellen lediglich Werte dar, die kaum ins Gewicht fallen. Auf den Körper wirken praktisch nur tangentiale Kräfte, deren Grösse jedoch sowohl in der Längsrichtung des Körpers wie auch entlang seines Umfanges verschieden ist. Vorne an der Bauchseite sind sie am grössten und vermindern sich von hier gegen die Rückenseite sowie gegen das hintere Körperende bis auf Null. Das Tier kreist also offenbar um sein Hinterende als Mittelpunkt entlang dem Mantel eines flacheren oder spitzeren Kegels, wobei die Bauchseite — wo die tangentiale Triebkraft am grössten ist — nach aussen gerichtet ist. Insofern zu dieser Trichterdrehung noch eine longitudinale Kraftkomponente hinzukommt, bewegt sich das Tier während der Beschreibung des Kegelmantels auch langsam vorwärts. An lebenden Individuen gelang es dem Verfasser bisher noch nicht, diese Bewegungsform in einer jeden Zweifel ausschliessenden Weise zu beobachten.

Bei Bewegungen, die mit einer Rotation um die Längsachse kombiniert sind, wird jede einseitige Veränderung der motorischen Kräfte, die nur an dem einen Körperende auftritt, natürlich nur ein Kreisen längs eines Kegelmantels zur Folge haben. So ist es denn äusserst wahrscheinlich, dass — hinsichtlich des Auslösungsmechanismus — noch weitere Modifikationen der am lebenden *Paramecium* zu beobachtenden Kegelschwingung möglich sind. Unter ihnen werden sich vielleicht auch solche befinden, die auf eine lokale Tätigkeitsveränderung der Körperzilien zurückgeführt werden können.

8. Ausweichbewegungen

In »schlecht gelungenen« Präparaten, wenn das Fixationsmittel wegen der verhältnismässig allzu grossen Menge Zuchtwassers zu stark verdünnt wird oder sich nicht genügend schnell mit diesem vermischt, können zahlreiche

Individuen angetroffen werden, deren Körperzilien sich im allgemeinen nicht in Wellen anordnen, während in der Peristommulde auch hier gut entwickelte Wellenkämme sichtbar sind. Diese verlaufen aber — ebenso wie bei der nutritorischen Variante der Schraubenbewegung — quer zur Achse der Peristommulde, während der aktive Schlag nach links rückwärts, gegen die Mundöffnung zu gerichtet ist (Abb. 51—52). Diese Bilder halten also scheinbar die charakteristische nahrungseinstrudelnde Tätigkeit der Peristomalziliatur bei den thigmotaktisch festsitzenden Tieren fest.

Nach eingehenderen Überlegungen können aber die betreffenden Individuen dennoch nicht als solche »stehend weidende« *Paramecien* angesprochen werden. Hauptsächlich deshalb nicht, weil beim Giessen des Fixationsmittels in das Zuchtwasser zweifellos jedes in Ruhestellung befindliche Tier aufgeschreckt wurde. Einer derartigen Erklärung widerspricht auch schon der Umstand, dass eine ausschliessliche Beschränkung der Zilienwellen auf das Mundfeld — wie gezeigt wurde — gerade in jenen Präparaten dominiert, bei deren Herstellung infolge eines technischen Kunstfehlers keine genügend rasche Fixationswirkung erzielt werden konnte.

Die Peristomalzilien stehen in diesem Falle offensichtlich nicht im Dienste des Nahrungserwerbes, sondern betätigen sich als lokomotorische Kräftefaktoren. Bei ausschliesslicher bzw. vorwiegender Strudelung dieser Wimpern kommt — worauf bereits von mehreren Autoren hingewiesen wurde (*Khawkine*, 1888; *Jennings*, 1914; *Alverdes*, 1922; *Ludwig*, 1929) — infolge der Wirkung der longitudinalen sowie der sich aus der schrägen Lage des Mundfeldes ergebenden rotatorischen Kraftkomponenten eine charakteristische Abwehr- bzw. Vermeidungsbewegung des Körpers zustande. Diese Bewegungsreaktion kann besonders an der Grenze von unangenehmen chemischen Reizzonen wahrgenommen werden und kommt in einem Abschwenken des Vorderendes in der Richtung der Dorsalseite, also weg von einer bestimmten, morphologisch differenzierten Seite des Körpers, sowie in einer gewissen gleichzeitigen Rechtsdrehung zum Ausdruck.

An den während der Ausführung einer solchen Ausweichreaktion fixierten Individuen kann am linken Peristomrand häufig ein (eventuell zwei) aus Körperzilien geformter, longitudinaler, leicht nach rechts gewundener, also mit der Peristommulde nahezu gleich verlaufender Wellenkamm beobachtet werden. Die Schlagrichtung dieses Wellenkammes ist ein Spiegelbild derjenigen der Peristomalwellen, sie erfolgt also (ebenso wie das Schlagen der Körperzilien während der Normalbewegung) nach rechts hinten (Abb. 53—54). Die Hauptaufgabe dieser Zilienwelle dürfte wohl darin bestehen, die Rotation um die Längsachse abzubremsen und hierdurch eine Dorsalwendung des vorderen Körperendes ohne Umdrehung zu ermöglichen (vgl. *Ludwig*, 1929, S. 762). Es scheint, dass die eine der Varianten (*e*) der Kegelschwingung so zustande kommt, dass diese am linken Peristomrand entstehenden Wellenkämme all-

mählich auch in das Gebiet der Mulde selbst übergreifen und deren ursprüngliche, gegen die Mundöffnung zu schwingende Zilienwellen unterdrücken.

Wenn man das Verhalten der lebenden Tiere an der Grenze irgendeiner unangenehmen Reizzone untersucht, wird man regelmässig und in grosser Mannigfaltigkeit auch kurze Ausweichbewegungen beobachten können, welche mit dem oben beschriebenen Mechanismus der einfachen aboralen Abschwenkung nicht erklärt werden können. Auf diese an einer Stelle oder als Unterbrechung der Normalbewegung auftretenden und häufig überaus verwickelten Richtungsänderungen hatte schon *Alverdes* hingewiesen. Es ist für sie in erster Linie charakteristisch, dass die auch hier meistens mit Rotation kombinierte Abschwenkung *gegen jede beliebige Körperseite* zu erfolgen kann. Sie können offenbar als unmittelbare Reaktionen angesehen werden, da sich die Tiere mit ihrer Hilfe von den unangenehmen Reizzonen fernzuhalten vermögen. Zu ihrer Erklärung müsste man demnach annehmen, dass die Zilien an der der Reizquelle zugekehrten vorderen Körperhälfte anders oder zumindest energischer schlagen als sonst auf der Körperoberfläche.

In den Präparaten wurden zahlreiche Bilder gefunden, welche diese Beobachtungen im vollen Ausmass bestätigen und gleichzeitig auch ein Licht auf den Charakter des grundlegenden Wimpermechanismus werfen. Es ist für sämtliche in Rede stehenden Individuen kennzeichnend, dass die koordinierte Tätigkeit der Körperziliatur im allgemeinen aufgehört hat. Dagegen sieht man ausnahmslos, in jedem Fall um das Vorderende einige vereinzelte, in der verschiedensten Weise verlaufende und ausschlagende, vorzeitig zu Ende gehende, aber ausserordentlich stark ausgeprägte Wellenkämme. Ihre Tätigkeit vermag also das vordere Körperende aus der ursprünglichen Lage in die verschiedensten Richtungen abzuschwenken. Betrachtet man nun die Schlagrichtung der betreffenden Wellenkämme, so erfolgt das Ausweichen in Abb. 55 nach rechts, in Abb. 56 nach rechts und ventral, in Abb. 57 dorsal und etwas nach links. In Abb. 58 dagegen kommen die Kräfte bereits in rein tangentialer Richtung (nach rechts) zur Geltung, obwohl auch in den obigen Beispielen mit einer gewissen Achsendrehung zu rechnen ist. Weitere gute Beispiele für die grosse Mannigfaltigkeit, die in einer solchen lokalen Veränderung der Zilientätigkeit möglich ist, bieten die Abbildungen 59—61. In den ersten zwei Abbildungen erkennt man an der Hinterseite des Körpers Wellenkämme, die sich nach vorne fächerartig ausbreiten, nach rückwärts allmählich verblassen und welche in ihrer Gesamtheit offenkundig bestrebt sind, das Vorderende nach links zu verdrehen. In Abb. 61 haben hingegen die am linken Peristomrand und zum Teil schon in der Mulde befindlichen Zilien ihre normale Schlagrichtung um etwa 180° verändert und schlagen in drei kurze parallele Wellenkämme geordnet im Bild nach links vorwärts aus. Auf ihre Wirkung hin schwenkt also das Vorderende des Tieres nach links ab, während der ganze Körper eine leichte Rückwärtsbewegung ausführt. Dieses Bild verdient vor allem deswegen besondere

Beachtung, weil es deutlich zeigt, dass eine lokale Modifikation der Zilientätigkeit auch auf den Bezirk der Peristommulde übergreifen kann. In der vorliegenden Abbildung sind nur noch im proximalen Abschnitt der Mulde einige ursprüngliche, gegen die Mundöffnung zu strudelnde Zilienwellen geblieben.

9—10. Kreisende Bewegung bzw. Bogenschwimmen ohne Rotation

Bei alleiniger Strudelung der Peristomalzilien entsteht, insofern diese Tätigkeit eine längere Zeit anhält, an Stelle einer einfachen aboralen Abschwenkung eine charakteristische kreisende Bewegung des Körpers, die gewöhnlich in einer einzigen Ebene vor sich geht. Das *Paramecium* schwingt in diesem Falle mit der Dorsalseite voran und führt ungefähr um sein Hinterende als Drehpunkt eine kreisende Bewegung aus. Laut den Feststellungen verschiedener Forscher kann eine solche Bewegung jederzeit durch stark verdünntes $NaHCO_3$ oder NaJ experimentell hervorgerufen werden. In diesem Falle vermindert sich nämlich die Tätigkeit der Körperzilien, wird ungeordnet, die Translation hört also auf, während die Peristomalzilien noch eine längere Zeit hindurch mit unveränderter Intensität weiterschlagen.

Wenn die Körperzilien nicht vollständig zu schlagen aufhören und so infolge ihrer Schlagtätigkeit sowie infolge der longitudinalen Kraftkomponente der Peristomalzilien am Körper auch noch ein gewisser translatorischer Impuls zur Geltung gelangt, ändert sich der Charakter der Bewegung : das *Paramecium* schwimmt dann im Kreise, wobei seine Dorsalseite dem näher oder weiter vom Tier entfernten Kreismittelpunkt zugewendet bleibt *(Ludwig,* 1929).

Ein einfaches Bogenschwimmen ohne Rotation kann aber nicht nur infolge der stärker zur Geltung kommenden Triebkraft der Peristomalwimpern, sondern auch infolge der Wirkung einer *besonders regulierten Zusammenarbeit der Körperziliatur* eintreten. So sieht man z. B. im Mikroskop häufig Kreisbahnen beschreibende Individuen, an deren einen (beliebigen) Seite ein die freie Bewegung behindernder Fremdkörper, beispielsweise ein Pilzfaden haftet. Bei der Bewegung des Körpers können in diesem Fall offenkundig nur die longitudinalen Komponenten der motorischen Triebkräfte eine Rolle spielen, wobei deren Grösse an der einen Körperseite grösser sein wird als an der entgegengesetzten. Auch hier ist die Körperseite mit der jeweils geringsten Translation natürlich dem Mittelpunkt der Kreisbahn zugekehrt. Die entsprechende Wellenanordnung wird in Abb. 62 und 63 gezeigt. Aus diesen Abbildungen geht gleichzeitig auch mit aller Deutlichkeit hervor, dass die ausgeprägten quergestellten Wellenkämme *an jeder beliebigen Körperseite* auftreten können, dass also die Ventralseite nicht immer zwangsläufig nach aussen gekehrt sein muss.

Ein besonders gutes Beispiel für diese Bewegungsform sieht man an den vom *Didinium* von der Seite her angegriffenen Individuen. Ein solcher Fall wird in Abb. 64 veranschaulicht. Wegen des an seinem Körper haftenden

Raubtieres ist das *Paramecium* nicht imstande, um seine Längsachse zu rotieren, so dass die Zilien lediglich an der dem Angriffspunkt entgegengesetzten Körperseite und nur in kaudale Richtung schlagend zu wirken vermögen. Die quergestellten Wellenkämme fehlen infolgedessen an der dem Raubtier zugekehrten Seite, um allmählich hervorzutreten und sich fächerförmig der entgegengesetzten Körperseite zu auszudehnen. Dieser Fall beweist in überzeugender Weise, *wie plastisch der* die Zilientätigkeit *koordinierende Mechanismus ist* und wie weitgehend er sich den eventuellen momentanen Zwangslagen anzupassen vermag.

11: Auf der synchronen Tätigkeit der Ziliatur beruhende Bewegungsformen

Bei Beobachtung der lebenden Tiere wird man zum Schluss gelangen, dass das *Paramecium* auf momentane Reizwirkungen nicht nur mit Bewegungsänderungen antworten kann, die auf der metachronisch geregelten Tätigkeit seiner Zilien beruhen, sondern dass es auch Bewegungsreaktionen gibt, die auf einen gleichfalls koordinierten, aber synchronen Bewegungsmodus der Zilien zurückgeführt werden können. Eine derartige Zilientätigkeit wird man z. B. dann vermuten dürfen, wenn die Schraubenbahn des seine Normalbewegung ausführenden Tieres plötzlich durch ein einmaliges Zurückprallen unterbrochen wird, wobei sich dieses Zurückprallen nur auf kurze, gleichförmige Streckenabschnitte von einem Bruchteil der Körperlänge beschränkt. Diese Erscheinung kann natürlich auch an Individuen, die unter natürlichen Lebensbedingungen leben, wahrgenommen werden ; mit besonderer Regelmässigkeit tritt sie jedoch auf, wenn dem Zuchtwasser verschiedene Reizstoffe zugesetzt werden. Für dieses kurze Zurückprallen ist es ferner charakteristisch, dass die frühere Achsenstellung des Körpers im grossen und ganzen beibehalten wird.

Die obige Annahme wird durch einige in den Präparaten gefundene Exemplare anscheinend bestätigt (Abb. 65—68). Die Körperzilien bilden an diesen Tieren keine Wellen, doch sind sie auch nicht ungeordnet wie häufig an den schlecht fixierten Individuen. Den Anzeichen nach sind sämtliche Zilien im Endstadium eines einzigen synchronen Schlages, u. zw. stets nach links vorne auf die Körperfläche geneigt festgehalten worden. Die Schwanzzilien dieser Exemplare biegen sich ebenso gegen das Vorderende des Körpers um wie bei den dauernd nach rückwärts schwimmenden Tieren. Es ist beachtenswert, dass die Zilien hier ausnahmslos in jener Stellung erstarrt sind, die dem Anfangsstadium der normalen Zilienbewegung (also der Schlagrichtung nach rechts hinten) bzw. dem Endstadium der regressiven Phase entspricht. Es ist dies also jene Lage, in welcher die Winkelgeschwindigkeit der im Sinn des Uhrzeigers kreisenden Zilie auch sonst am kleinsten ist *(Párducz*, 1953). Wenn man nun diese Exemplare näher untersucht, so lassen sie sich je nach der Bewegungsstellung der fixierten Zilien in zwei Kategorien einreihen. An dem

einen Teil der Tiere biegen sich nämlich sämtliche Zilien in gestreckter, gerader Haltung nach vorne (Abb. 65—66), an dem anderen Teil sind die nach links vorne geneigten Zilien bogenförmig gekrümmt (Abb. 67—68). Es ist leicht möglich, dass die Wimpern nur im ersten Fall das Endstadium eines nach vorne links gerichteten Wirkungsschlages widerspiegeln, während die in die zweite Kategorie gehörenden Bilder die charakteristische Stellung der am Ende der Regression erstarrten Zilien festhalten. Diese letzteren Bilder können demnach auch so gedeutet werden, dass von einem gegebenen Zeitpunkt (Reizwirkung) angefangen jene Zilien, die während ihrer metachronischen Tätigkeit gerade in das Endstadium der Regression gelangt waren, nicht ihre Bewegung fortsetzen, sondern übergangsweise in dieser Lage verbleiben und hier die mit einem metachronischen Phasenunterschied regressierenden Nachbarzilien abwarten. Es ist also nicht ausgeschlossen, dass es sich in diesem Falle eigentlich gar nicht um einen in dieselbe Richtung ausgeführten synchronen Schlag der Wimpern handelt, sondern darum, dass infolge der Reizwirkung sämtliche Zilien sukzessive für eine kurze Zeit am Ende der regressiven Phase stehen bleiben. In diesem Falle wirkt vom Auftreten der Reizwirkung an nur noch der infolge der Regression der Zilien entstehende *Rücktrieb* auf den Körper ein. Dieser Effekt kann aber höchstens ein Bremsen der normalen Fortbewegung, ein momentanes Stocken des Tieres bewirken.

Diese Annahme wird auch durch die Bilder unterstützt, an welchen noch die verschwommenen Spuren jener regelmässigen, in einem Steigwinkel von ungefähr 60° verlaufenden, metachronischen Zilienwellen zu sehen sind, mit deren Hilfe wahrscheinlich das Tier *vor* dem momentanen Aufhören der Zilientätigkeit auf einer rechtsgewundenen Bahn vorwärtsschwamm (Abb. 68). Bei einem wirklich synchronen Ausschlag der Körperzilien könnte nämlich von einer *allmählichen* Glättung der *früheren* Wellenkämme nicht die Rede sein. Aus verschiedenen Beobachtungen darf auch der Schluss gezogen werden, dass eine derartige Modifikation der Tätigkeit der Gesamtziliatur häufig vor dem Übergang zu einer neuen Bewegungsform auftritt. Zum Beispiel dann, wenn das Tier an Stelle der die normale Fortbewegung auslösenden rechtsgewundenen Wellenkämme das für eine Ausweichreaktion oder für das Zurückschwimmen charakteristische Wellensystem einstellt.

Zur Klärung des Mechanismus der auf der synchronen Tätigkeit beruhenden Bewegungsformen sind also noch weitere Untersuchungen notwendig.

12. Gestörte, ungeordnet verlaufende Zilienwellen

Ähnlicherweise kann auch aus den Zilienwellenmustern jener Individuen vorläufig noch nicht viel entnommen werden, an denen die metachronischen Wellenkämme anscheinend ohne jede Ordnung, oft in launenhaftem Durcheinander die Körperfläche bedecken. In der Verteilung der Wirkungskräfte

herrschen in diesen Fällen zumeist derart verwickelte Verhältnisse, dass es unmöglich ist die Bewegungsform festzustellen, die zu der gegebenen Schlagrichtung des Tieres gehört.

Jedenfalls weist die Tatsache, dass sich die Zilien überhaupt zu Wellen anordnen, darauf hin, dass ihre Tätigkeit auch in diesem Fall koordiniert ist. Diese Regelung der Zilientätigkeit kommt aber nur innerhalb kleinerer Bezirke zur Geltung. Sie fasst also nicht die Einzelleistungen *sämtlicher* Bewegungselemente des Zellkörpers zu einer, zur Ausführung einer bestimmten Bewegungsform erforderlichen harmonischen Gesamtleistung höherer Ordnung zusammen. Im Gegensatz zur ziemlich weit verbreiteten Ansicht demonstrieren die vorliegenden Bilder auch in besonders überzeugender Weise, dass bei den Ziliaten die Koordination der Zilientätigkeit nicht nach einem starren, ein für allemal festgestellten Schema erfolgt. Im Zusammenhang mit der freien Lebensweise und der Mannigfaltigkeit der aus der Umgebung stammenden Reizwirkungen ist das Tier imstande, die Tätigkeit seiner Zilien gleichzeitig an mehreren Punkten seiner Körperoberfläche, selbst innerhalb engerer Zilienbezirke auf verschiedene Weise zu beeinflussen. Man dürfte kaum fehlgehen, wenn man an der Ziliatur eines Teils dieser Exemplare die Wirkung von gleichzeitig von verschiedenen Seiten auf den Körper einwirkenden energischen Reizen zu erkennen vermeint (Reizwirkung des Fixationsmittels?), während ein anderer, bedeutender Teil von ihnen vielleicht die verschiedenen Phasen eines plötzlichen Überganges von einer Bewegungsform in die andere festgehalten hat. Aus dem bisher gesammelten grossen Material das zur Illustration dieser verschiedenartigen Wimpertätigkeit dient, seien nun als Beispiele vier Bilder vorgeführt.

In Abb. 69 und 70 sind die teilweisen Spuren eines linksgewundenen Wellensystems erkennbar. Am überwiegenden Teil der Körperfläche, hauptsächlich in der Mittelzone, ist dieses aber völlig verschwommen, und statt dessen sieht man zahlreiche kurze, in die verschiedensten Richtungen schlagende Wellenkämme. In Abb. 71 sind Zilienwellen zu sehen, die im wesentlichen nach rechts gewunden sind und nach rechts hinten ausschlagen. Sie verlaufen jedoch unregelmässig, im Zickzack, da sie stellenweise von linksgewundenen und nach rechts vorne strudelnden kurzen Wellenabschnitten unterbrochen werden.

Besonders interessante Verhältnisse spiegelt Abb. 72 wider. In dem linken oberen und rechten unteren Bezirk der dem Betrachter zugewandten Bauchseite richtet sich der wirksame Schlag nach links rückwärts. Gleichzeitig schwingen jedoch die Peristomalzilien aus dem Mundfeld heraus, also nach rechts vorne. Am auffallendsten ist indessen die am Körper nach links vorne gerichtete Schlagrichtung der rechts und etwas hinter der Peristommulde befindlichen drei kurzen Wellenkämme. An diesem Exemplar wurde also — wenngleich nur innerhalb eines kleineren Bezirkes — endlich *die bisher vergeblich gesuchte Schlagrichtung* gefunden, die bei einer in dieser Richtung erfolgenden Schlagtätigkeit sämtlicher Zilien ein Zurückfahren in einer Linksschraube

ergeben würde. Mit anderen Worten: von allen möglichen Schlagrichtungen gelang es bisher nur eine einzige nicht am *Paramecium* nachzuweisen, nämlich den rein apikalwärts gerichteten Schlagmodus der Zilien *(Párducz*, 1953).

Die Anordnung der Zilienwellen während der Teilung und der Konjugation

In den Anfangsstadien der Teilung, wo also die Einschnürung noch kaum zu erkennen ist (Abb. 73 und 74), gehen die metachronischen Wellen der vorderen Körperhälfte ohne Unterbrechung oder Verschiebung fortlaufend in die Wellenkämme des Hintertieres über. In einem etwas fortgeschritteneren Teilungsstadium (Abb. 75) werden die Zilienwellen infolge der in der äquatorialen Zone erfolgenden Verengung zusammengedrängt, wobei sich auch ihr Ablauf — besonders am Vorderende des hinteren Tochterindividuums — etwas verändert. Die fortlaufende Verbindung ist aber auch jetzt noch vorhanden, und man findet an beiden Geschwistern noch gleichgerichtete und identisch verteilte Wellenkämme. Einen noch späteren Zeitpunkt der Teilung zeigt Abb. 76, wo die Einschnürung bereits so schmal ist, dass ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen den Zilienwellen der beiden Hälften nicht mehr nachgewiesen werden kann. An den beiden in Ausbildung begriffenen Tochterindividuen wird aber die Tätigkeit sämtlicher Zilien noch immer zweifellos durch denselben Mechanismus geregelt. Die Zilienwellen sind nämlich hinsichtlich ihrer Anordnung und ihrer Verlaufsrichtung an beiden, nur noch locker miteinander verbundenen Tochtertieren fast völlig identisch. Nur im Endstadium der Teilung, wenn also die beiden Hälften nur noch durch einen mehr oder weniger dünnen Verbindungsfaden zusammenhängen und die beiden gesonderten Individuen in ihrem Differenzierungsprozess schon ziemlich fortgeschritten sind, werden die Zilien der beiden Geschwistertiere gesonderte Impulse erhalten. So kann z. B. das vordere Tier infolge verschiedener Reizwirkungen seine Bewegungsrichtung ändern, während das hintere sich auch weiterhin in der ursprünglichen Richtung fortbewegt und umgekehrt.

Auch während der Konjugation zweier Tiere könnte man annehmen, dass die Tätigkeit der Zilien beider Exemplare einheitlich reguliert wird, wie wenn es sich nur um ein einziges Tier handelte. Die Richtigkeit dieser Annahme erscheint desto wahrscheinlicher, als ja bekannt ist, dass die konjugierenden Partner an ihrer vorderen Bauchgegend sozusagen miteinander verschmelzen, so dass die Wanderkerne durch die vorübergehend ausgebildete Protoplasmabrücke gegenseitig ausgetauscht werden können. In den Präparaten trifft man tatsächlich oft konjugierende Paare, wo beide Tiere das gleiche Wellenmuster zeigen und die Zilienwellen von einem Partner zum anderen in gleicher Richtung verlaufen, wie wenn ein einziges Tier vorläge (vgl. *Gelei*, 1926—27, Abb. 6). Solche Bilder stellen aber noch keinen unbedingten Beweis dafür dar,

dass die Erregungsimpulse von einem Individuum zum anderen gelangen. Nach eingehender Untersuchung einer gewaltigen Anzahl von Präparaten gewinnt man den Eindruck, dass jeder der Konjugationspartner die Tätigkeit seiner Zilien selbständig reguliert (Abb. 77 und 78). Es ist jedoch auch stets in Betracht zu ziehen, dass die beiden Partner während ihrer gemeinsamen Fortbewegung auch gesondert von lokalen, den Rhythmus oder die Richtung des Wimperschlages beeinflussenden Reizwirkungen angegriffen werden können, sowie dass auch am Wellenmuster der entgegengesetzten Körperseiten von Einzeltieren sich bedeutende Abweichungen feststellen lassen.

Diskussion der Ergebnisse

Die in den letzten Jahrzehnten durchgeführten Untersuchungen und Versuche bestätigten die aufsehenerregende Feststellung der ersten Protistologen, dass der natürliche Zustand des *Paramecium* die Bewegung ist. Unter Bedingungen, wo der Skelettmuskel »in Ruhe« ist, geht die Tätigkeit der Ziliatur unverändert weiter, wobei sich das Tier selbst ununterbrochen fortbewegt. Es ist merkwürdig, dass es nicht zur Auslösung der Bewegung, sondern gerade zu deren Aufhören einer besonderen Reizwirkung bedarf (Thigmotaxis).

Die Feststellungen der Mehrzahl der Forscher über diese interessante und auf eine der elementaren Eigenschaften des Protoplasmas hinweisende Frage lassen sich kurz wie folgt zusammenfassen.

Die spontane Bewegung des Tieres ist die Folge der autonomen Schlagtätigkeit der einzelnen Zilien, wobei nur die Ersetzung der zu den die Schlagtätigkeit auslösenden chemisch-energetischen Prozessen notwendigen Betriebsstoffe aus dem Zellinnern erfolgt. Damit aber die Einzelleistung der Zilien zur produktiven Gesamtleistung des Zilienkleides summiert werde, ist es vor allem notwendig, dass sich die Arbeit der einzelnen Zilien auf die der anderen abstimme. Es hat den Anschein, dass die primäre Koordination der rhythmisch-automatischen, aber unregelmässigen Schlagtätigkeit der einzelnen Zilien auf inneren, rhythmischen, erregungsauslösenden Vorgängen beruht. In einem reizlosen, homogenen Milieu und bei einem gegebenen physiologischen Zustand des Einzellers wird also wahrscheinlich diese zentrale Koordination den Rhythmus und die Richtung des Schlages auf der ganzen Körperoberfläche eindeutig bestimmen.

Insbesondere im Interesse einer Klärung des Mechanismus der Reizbewegungen müsste man genau wissen, welches die obenerwähnte, bloss durch die zentralen Impulse geregelte Bewegungsform des *Paramecium* ist. Die Fachliteratur bezeichnet übereinstimmend als solche die entlang einer linksgewundenen Schraubenlinie erfolgende Fortbewegung des Tieres. Laut der aus den Schnellfixierungspräparaten erhaltenen Ergebnisse weist aber — wie

gezeigt wurde — bereits diese linksschraubende »normale« Bewegungsform zahlreiche Modifikationen auf. Von diesen Bewegungsvarianten kann offenkundig jene als primär angesehen werden, bei deren Auslösung sämtliche Zilien des Tieres in jeder Hinsicht, also gleicherweise vom Gesichtspunkt des Rhythmus wie der Richtung des Schlages, in identischer Weise tätig sind. Das Zilienwellenmuster gewisser fixierter Exemplare entspricht denn auch tatsächlich dieser Bedingung: sämtliche Zilien der Körperfläche — also auch das Zilienkleid der Peristommulde — bilden hier gleichgerichtete und gleichmässig verteilte Wellenkämme. Es darf also angenommen werden, dass in diesen Fällen die resultierenden Wimperkräfte nicht eine schraubenförmige Bewegunsbahn, sondern eine einfache Translation mit gleichzeitiger Linksdrehung um die Körperlängsachse hervorrufen. Bei der Untersuchung der Bewegung der lebenden Tiere konnte die Feststellung gemacht werden, dass diese auf Grund der fixierten Bewegungsbilder anzunehmende Bewegungsform, d. h. die geradlinige Bohrbewegung des Tieres, tatsächlich vorkommt. *Diese Art der Lokomotion*, an die sich das *Paramecium* sowohl in bezug auf die Ausbildung wie auch Verteilung der lokomotorischen Organellen anscheinend angepasst hat, *kann also als die Grundbewegungsform des Tieres betrachtet werden.*

Vom Gesichtspunkt des natürlichen Selbsterhaltungsvermögens wird aber die Fähigkeit zur aktiven Ortsveränderung dem Infusor offensichtlich nur dann einen Vorteil bedeuten, wenn die geordnete Zusammenarbeit der Zilien — den ständig wechselnden Anforderungen des Lebens entsprechend — zwischen gewissen Grenzen modifizierbar ist. Die Mannigfaltigkeit der in den vorhergehenden Abschnitten geschilderten Bewegungsbilder legt tatsächlich von der Plastizität des Koordinationsmechanismus ein beredtes Zeugnis ab.

Das Verhalten des Tieres in einem gegebenen Augenblick wird also demgemäss — ausser durch den jeweiligen inneren physiologischen Zustand — vor allem durch das momentane Resultat des ständigen Kampfes zweier gegensätzlicher Einflüsse bestimmt. Der eine ist der endogene Koordinationsreiz, der den Organismus zum Einhalten der normalen Bewegungsbahn zu zwingen bestrebt ist. Der andere Einfluss ist die Wirkung der weiteren, den Organismus von aussen angreifenden Reize, die versuchen diesen primären physiologischen »Gleichgewichtszustand« des Einzellers für eine längere oder kürzere Zeit zu stören. Das Mittel, durch welches diese Wirkungen zur Geltung kommen, ist die Zilie, die auf die verschiedensten Reizwirkungen durch Veränderung ihres Schlagmodus ausserordentlich empfindlich reagiert. Der Zeitpunkt, in welchem der Reiz in die normale Schlagart der Zilie eingreift, fällt hierbei zweifelsohne in die regressive Phase der vollständigen Bewegungsperiode.

Die Wandlungsfähigkeit der Bewegungsbahn des *Paramecium* kann letztlich auf zweierlei Eigenschaften der Elemente des lokomotorischen Apparates zurückgeführt werden. Einesteils auf jene Eigenschaft der einzelnen Zilien, dass sich die Richtung ihres wirksamen Schlages und der Rhythmus ihrer Tätig-

keit (d. h. Schlagintensität) zwischen weiten Grenzen verändern können. Anderenteils spielt aber auch jener Umstand eine bedeutende Rolle, dass diese einzeln oder zusammen auftretenden zweierlei Funktionsveränderungen sich nicht zwangsläufig auf jedes einzelne Glied des Zilienkleides im selben Sinn und Ausmass erstrecken müssen. Die ursprünglich endogen bestimmte Richtung und Rhythmik der Zilienbewegung kann sich also *auch an einzelnen Körperbezirken, lokal, unabhängig von der Tätigkeit der übrigen Zilien modifizieren.* Angesichts der Tatsache, dass sich der Lokomotionsapparat des *Paramecium* aus mehreren Tausenden Zilien zusammensetzt, kann sich aus der Kombination der erwähnten Faktoren eine ausserordentlich grosse Zahl von Koordinationsfällen ergeben. In Wirklichkeit ist es denn auch nahezu unmöglich, in den Präparaten zwei Exemplare zu finden, deren Zilienwellenmuster in jeder Beziehung genau miteinander übereinstimmen.

Geht man von der Bewegungsform aus, die dem zentralen Koordinationsreiz entspricht, so konnten bisher in der Zilientätigkeit der Tiere die untenstehenden, hauptsächlichen Varianten abgeleitet und nachgewiesen werden.

1. An der Körperfläche verändern sämtliche Zilien ihre ursprüngliche, nach rechts hinten gerichtete, mit der Körperlängsachse einen Winkel von etwa 45° einschliessende Schlagrichtung in sozusagen jede andere Richtung. Das Ergebnis hiervon ist, dass bei Beibehaltung des Charakters einer einfachen Bohrbewegung *die Rotationsgeschwindigkeit verändert wird.* Innerhalb dieser Gruppe können folgende charakteristische und am häufigsten vorkommende Fälle unterschieden werden :

a) Eine Verdrehung der Schlagebene um 45°, also ein rein rückwärts gerichteter Wirkungsschlag, querverlaufende Zilienwellen *(reine translatorische Bewegung ohne Rotation).**

b) Verschiebung der Schlagrichtung im Sinne des Uhrzeigers um 90°; es erscheinen also an der Körperoberfläche des Tieres linksgewundene Wellenkämme *(rechtsdrehende Bohrbewegung entlang einer Geraden).*

c) Verdrehung um 135°, tangential nach links ausschlagende Zilien und längsgerichtete Wellenkämme *(Rotation an Ort und Stelle nach rechts).*

d) Verdrehung der aktiven Schlagebene um 270°, Schlagrichtung nach rechts vorne, linksgewundene, aber am Körper nach rechts *vorne* strudelnde Zilienwellen *(geradliniges Zurückfahren, kombiniert mit Rotation nach rechts).*

e) Verdrehung um 315°, Wirkungsschlag rein nach rechts, längsgerichtete Wellenkämme *(Rotation an Ort und Stelle nach links).*

2. Es verändert sich die Schlagrichtung sämtlicher Zilien der Körperoberfläche, u.zw. derweise, dass die Zilien an der einen (aber beliebigen) Seite

* Neuere, am lebenden Objekt durchgeführte Kontrollversuche sprechen eindeutig für eine dem Sinne des Uhrzeigers entgegengesetzte Drehungsrichtung während der Regression. Näheres über diesen unerwarteten Befund und über seine Konsequenzen bezüglich der Zilienmechanik wird in einer demnächst erscheinenden Abhandlung ausführlich berichtet werden. Anm. während der Korrektur.

des Körpers in kaudaler Richtung ausschlagen, während die koordinierte Bewegung der an der entgegengesetzten Körperseite befindlichen Zilien aufhört, bzw. ihre Schlagtätigkeit zum Stillstand kommt. An der einen Seite sieht man schräggerichtete, gegen die entgegengesetzte Körperseite zu allmählich verschwimmende Zilienwellen *(Bogenschwimmen ohne Rotation bzw. Kreisbewegung in einer Ebene nach jeder beliebigen Körperseite)*.

3. Die Körperzilien schlagen unverändert nach rechts hinten, während sich die Schlagrichtung der Peristomalzilien ändert. Extremfälle :

a) Das Tier stellt in der Peristommulde sein Wellensystem senkrecht zu den Wellenkämmen der Körperfläche ein. Es entsteht die häufigste, in der Literatur als normal bezeichnete Bewegungsform des *Paramecium (Vorwärtsbewegung in einer linksgewundenen Schraubenlinie mit der Bauchseite nach innen)*.

b) Die Anordnung der Zilienwellen am Körper und in der Mulde ist dieselbe wie im vorigen Fall, doch strudeln die Peristomalzilien nach aussen *(rechts vorne)* aus *(langsame Fortbewegung in einer linksgewundenen Schraube, wahrscheinlich mit erweiterter Kegelschwingung des Vorderendes)*.

c) Mannigfaltige Varianten zwischen den geschilderten Fällen *a)* und *b)*, u. zw. sowohl an den links- als auch an den rechtsdrehenden Exemplaren mit einer Wellenanordnung, bei welcher die Peristomalzilien zwischen den Schlagrichtungen nach rechts hinten und rein nach rechts bzw. nach links hinten und rein nach links sozusagen alle möglichen Zwischenstufen einnehmen können *(verschiedene Varianten der rechtsgewundenen Schraubenbewegung, die nur in der Schraubenweite differieren)*.

4. Die Schlagrichtung der Körper- und Peristomalzilien ist die gleiche wie im Falle 3/*a*, wobei sich aber die Intensität der Schlagtätigkeit zu Gunsten der Peristomalzilien verschiebt *(erweiterte Trichterbewegung des Vorderendes während einer langsamen linksschraubenden Vorwärtsbewegung)*.

5. Während einem rechtsschraubigen Zurückschwimmen (Fall 1/*d)* tritt in der Tätigkeit des Wimperkleides des vorderen Körperendes — auf eine bisher noch nicht geklärte Weise — eine einseitige Modifikation ein *(Rückwärtsbewegung bei Kegelschwingung des Vorderendes)*.

6. Die Körperzilien hören zu schlagen auf, während die Peristomalzilien nach links rückwärts, in die Richtung der Mundöffnung ausschlagen.

a) Wenn die ausschliessliche Tätigkeit der Peristomalzilien nur eine kurze Zeit dauert : *einmalige Dorsalwendung des Vorderendes* (mit einer geringen Achsendrehung nach rechts).

b) Bei einer längeren Strudeltätigkeit der Peristomalzilien : *Kreisbewegung um das Hinterende als Kegelspitze in einer Ebene*, aber — im Gegensatz zu Fall 2 — ausschliesslich mit der Dorsalseite voran.

7. Die Körperzilien stehen still oder schlagen mit verminderter Intensität nach hinten rechts oder links aus, während die Peristomalzilien in längsgerichtete

Wellenkämme geordnet tangential nach rechts strudeln *(Kegelschwingung an Ort und Stelle mit der Bauchseite nach aussen)*.

8. Bei der Ausführung der verschiedensten Bewegungsformen (Fortbewegung in einer rechts- oder linksgewundenen Schraube, Vorwärtsschwimmen ohne Rotation, Rotation um die Körperlängsachse nach rechts oder links, Zurückschwimmen in einer Rechtsschraube) kann sich die Schlagrichtung auch noch während einer kürzeren oder längeren Zeit innerhalb beliebiger Zilienbezirke mehr oder minder verändern. Aus einer solchen lokalen Veränderung der Zilientätigkeit entsteht eine fast unübersehbare Anzahl von Varianten des jeweils ausgeübten Bewegungsmodus, welche sich z. B. im Falle von Spiralschwimmen in einer verschieden starken Deformation der sonst regelmässigen Bewegungsbahn äussern.

Einer der interessanten möglichen Fälle bei diesem Zilienmechanismus ist jener, wenn sich z. B. bei Beschreibung einer linksgewundenen Bahn an der Seite des Tieres die Richtung oder Intensität des Schlages lokal verändert, doch stets nur in einem Zilienbezirk, der einer bestimmten Richtung im Raume zugekehrt ist *(rotierendes Bogenschwimmen)*.

9. Die Körper- und Peristomalziliatur hört mehr oder minder zu schlagen auf, während irgendwo an der vorderen Körperhälfte, in der Regel aber nahe zum Pol, für eine kurze Zeit ein System einer geringen Zahl von Wellen auftritt, die nur über eine kurze Strecke, aber in die verschiedensten Richtungen verlaufen *(Ausweichen des Vorderendes nach jeder beliebigen Körperseite)*.

10. Einmaliger synchroner Schlag sämtlicher Zilien der Körperoberfläche nach links vorne *(einfaches Zurückprallen auf einem kleineren Streckenabschnitt)*.

Die Aufzählung der hauptsächlichen Bewegungskombinationen, die auf eine totale oder lokale Veränderung der Ziliatur zurückzuführen sind, soll noch durch einige Bemerkungen ergänzt werden.

1. Bei der Besprechung der Entstehung der möglichen Varianten wurde neben der sich auf die Gesamtziliatur erstreckenden oder lokalen Veränderung der Schlagrichtung der Zilien die Modifikationen des Schlagrhythmus im wesentlichen vernachlässigt, obzwar das Tier schon durch die alleinige Veränderung des Schlagrhythmus über weitere reiche Möglichkeiten der Bewegungsveränderung verfügt.

2. Innerhalb der einzelnen Kombinationen spielt — wie dies schon an einigen Beispielen gezeigt wurde — auch die Dauer der veränderten Zilientätigkeit eine wesentliche Rolle. Bei Berücksichtigung dieses Zeitfaktors ergeben sich gleichfalls mannigfache Bewegungsmöglichkeiten. Man wird sich also über das Verhalten des Tieres nur bei gleichzeitiger Berücksichtigung auch dieses Faktors ein richtiges Bild machen können.

3. Besonders augenfällig im Leben des Tieres ist die besondere Rolle der Peristomalziliatur. Im einen Fall sind es die Zilien dieses Körperbezirkes, die sich bei Reizwirkungen dem Einfluss der die Tätigkeit des Zilienkleides primär

bestimmenden zentralen Koordination entziehen können. Im anderen Fall stellen sie dagegen innerhalb der sich empfindlich an die wechselnde Umgebung anpassenden Gesamtziliatur gerade das konservative Element dar, das bestrebt ist, die frühere Schlagart beizubehalten.

Wenn man die möglichen Varianten überblickt, so erhält man sozusagen von selbst die Erklärung auf die Frage, warum das von *Jennings* umgrenzte Aktionssystem des *Paramecium* unvergleichlich weniger Bewegungsmöglichkeiten enthält, als in Wirklichkeit vorkommen. Seiner Auffassung zufolge können nämlich die Modifikationen sich nur aus einer Kombination von drei Faktoren ergeben (Vorwärtsbewegung, Drehung um die Längsachse und Abweichung nach der aboralen Seite). Dabei setzte er den Kombinationsmöglichkeiten schon von Anfang an durch die Annahme enge Grenzen, dass die einzelnen Faktoren nur als sich im selben Sinn verändernde Resultierenden der Bewegungsimpulse der betroffenen Zilien in Rechnung gestellt werden dürfen. Tatsächlich variiert aber der Effekt des den einzelnen Faktoren entsprechenden Zilienmechanismus dadurch zwischen weiten Grenzen, dass die Schlagrichtung oder der Rhythmus der Zilien sich in verschiedenen Körperbezirken lokal verändern kann, eventuell sogar auch beide Faktoren gleichzeitig.

ZUSAMMENFASSUNG

Die in der vorliegenden Abhandlung besprochenen, mit dem Schnellfixierungsverfahren kombinierten Lebenduntersuchungen am *Paramecium* bestätigten und ergänzten sogar in bedeutendem Masse die gegenüber der allgemeinen Auffassung wiederholt hervorgehobenen Ergebnisse einiger Forscher. Die Koordination der Schlagtätigkeit der einzelnen Zilien des *Paramecium* erfolgt nämlich nicht nach einigen starren, ein für allemal bestimmten Schemata, sondern *das Tier vermag* auf äussere oder innere Reizwirkungen hin *die Tätigkeit seiner Zilien sogar gleichzeitig innerhalb mehrerer Oberflächenbezirke weitgehend zu beeinflussen.* Durch diese auch lokal durchführbare Beeinflussung des Zilienkleides für eine beliebige Zeit steht dem *Paramecium* eine derartige Mannigfaltigkeit der Bewegungsformen zur Verfügung, dass es in dieser Beziehung auch das Aktionssystem der einen oder anderen niederen Metazoe übertrifft. Das hier gewählte Untersuchungsobjekt demonstriert also nicht nur in bezug auf die morphologische, sondern auch auf die funktionelle Differenzierung in überzeugender Weise den auffallend hohen Vollkommenheitsgrad, den eine einheitliche Protoplasmamasse ohne zellige Organisation im Laufe der Phylogenese zu erreichen vermag.

LITERATUR

1. *Alverdes, F.:* Untersuchungen über begeisselte und beflimmerte Organismen, Arch. Entw. Mech. **52**, 221 (1922a).

2. *Alverdes, F.:* Studien an Infusorien über Flimmerbewegung, Lokomotion und Reizbeantwortung. Arb. aus dem Gebiet der exper. Biologie. H. 3. Berlin (1922b).

3. *Bozler, E.:* Reizphysiologische Untersuchungen an Paramaecium. Verh. Zool. Ges. Kiel. Zool. Anz. **2**, Suppl. (1926).

4. *Dembowski, J.:* Über die Nahrungswahl und die sog. Gedächtniserscheinungen bei. P. caudatum. Trav. Labor. biol. Neucki, Varsovie, **1**, (1921).

5. *Doflein, F.—Reichenow, E.:* Lehrbuch der Protozoenkunde, Jena (1916).

6. *Doflein, F.—Reichenow, E.:* Lehrbuch der Protozoenkunde, Jena (1949).

7. *Догель, Б. А.:* Общая протистология. Москва (1951).

8. *Gelei, J.:* Zilienstruktur und Zilienbewegung. Verh. Zool. Ges. Kiel. Zool. Anz. **2**. Suppl. (1926).

9. *Gelei, J.:* Eine neue Osmium-Toluidinmethode für Protistenforschung. Mikrokosmos, **20**, 5 (1926—27).

10. *Gelei, J.:* Eine mikrotechnische Studie über die Färbung der subpelliculären Elemente der Ziliaten. Z. Mikroskop. **51** (1934).

11. *Gray, M. A.:* Ciliary Movement, Cambridge (1928).

12. *Hirsch, G. Ch.:* Der Bau des Tierkörpers. In Bertalanffys Handbuch der Biologie. Bd. V. H. 1/2, Potsdam.

13. *Jennings, H. S.:* Die niederen Organismen. Ihre Reizphysiologie u. Psychologie. Leipzig u. Berlin (1914).

14. *Kahl, A.:* Urtiere oder Protozoa I. Wimpertiere o. Ciliata. In Dahl's Tierwelt Deutschlands. Jena (1930—33).

15. *Kalmus, H.:* Paramecium. Das Pantoffeltierchen. Jena (1933).

16. *Khawkine, M. W.:* Le principe de l'hérédité et les lois de la mécanique en application à la morphologie de cellules solitaires. Arch. Zool. expér. (II) T. 6 (1888).

17. *Koehler, O.:* Untersuchungsmethoden der allgemeinen Reizphysiologie und der Verhaltenforschung an Tieren. Method. wiss. Biol. 2. Herausg. von Péterfi. Berlin (1928).

18. *Ludwig, W.:* Untersuchungen über die Schraubenbahnen niederer Organismen. Zeitschr. vergl. Physiol. **9**, H. 5 (1929).

19. *Ludwig, W.:* Zur Theorie der Flimmerbewegung (Dynamik, Nutzeffekt, Energiebilanz). Zeitschr. vergl. Physiol. **13** (1931).

20. *Ludwig, W.:* Das Rechts-Links-Problem im Tierreich u. beim Menschen. Berlin (1932).

21. *Ludwig, W.—Schlicksupp, E.:* Der Windungssinn der Schraubenbahnen von Mikroorganismen und Larven als philogenetisches Hilfsmittel. Zool. Anz. **147**, H. 5—6 (1951).

22. *Párducz, B.:* A csavart-utánzó Ciliata-alkat biológiai jelentősége (Über die biologische Bedeutung des schraubigen Körperbaues der Ciliaten. Ungar. mit deutscher Zusammenfassung). Acta Biol, **4**, 1, 12 (1936).

23. *Párducz, B.:* Új gyorsrögzítő eljárás a véglénykutatás és oktatás szolgálatában. (Neues Schnellfixierungsverfahren im Dienste der Protistenforschung und des Unterrichtes. Ungar. mit deutscher Zusammenfassung). Annal. Nat. Mus. Nation. Hung. **2** (1952a).

24. *Párducz, B.:* Die Fixation als Reizwirkung in der Tätigkeit der Zellorganellen. Acta Biol. Hung. **3**, 1 (1952b).

25. *Párducz, B.:* Zur Mechanik der Zilienbewegung. Acta Biol. Hung. **4**, 1—2 (1953)

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИОЛОГИИ РАЗДРАЖЕНИЯ У ЖГУТИКОВЫХ ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ОРГАНИЗМОВ

1. Анализ способов движения Парамециума

Б. Пардуц

Резюме

Автор исследовал физиологию раздражения у жгутиковых одноклеточных организмов, исходя из закономерностей функций отдельных жгутиков Парамециума, как частьях его локомоторного прибора. Автор исследовал функцию жгутиков во время нормального движения, а так же и во время основных двигательных реакций. Самой существенной частью его методики является метод скорого фиксирования (разработано самим автором), благодаря которому можно внезапно вызвать окоченение жгутиков во время их естественной функции. Таким образом автор сделал серию »моментальных снимков«, представляющих верную картину способов движения жгутиков. Благодаря этому, автору удалось подробно изучить механизм двигательной реакции. Для проверки и дополнения данных полученных в течение исследования препаратов, автор пользовался и современными методами исследования живых организмов.

В ходе исследований, автор установил следующие основные формы движения Парамециума и большое число вариантов этих форм: 1—2. Движение вперед по пути извивающемся влево и вправо. 3. Винтовой ход с уклоном пути движения. 4. Трансляторное движение без вращения. 5. Движение Парамециума назад. 6. Вращение около вертикальной оси. 7. Воронкообразное движение. 8. Обходное движение. 9—10. Циркуляционное (круговое) движение. 11. Движение основывающееся на синхронной функции жгутиков. Дополнительно он занимается вопросом координации функций жгутиков у делившихся и у конъюгирующих животных.

Автор из результатов исследований делает вывод, что координация функции отдельных жгутиков у Парамециума не происходит по одной, раз навсегда определенной схеме, а наоборот, животное под действием внешних или внутренних раздражений может одновременно регулировать функцию жгутиков на разных частях своего тела. Благодаря способности производить местное регулирование функции жгутиков, Парамециум располагает обильным, разнообразным движением, и его локомоторная система значнтельно превосходит двигательную систему некоторых низших организмов из группы метазоа.

TAFELERKLÄRUNG

Sämtliche Mikrophotographien mit Ausnahme von Abb. 4. auf Tafel I wurden von Tieren gemacht, die mit der Osmium-Hämatoxylin-Schnellfixierungsmethode behandelt waren. Vergrösserung ca. 340×.

Tafel I

Abb. 4. Der Verlauf der Basalkörperreihen an der Bauchseite von *Paramecium*. Hinter der Mittellinie des Körpers, etwas links der Eingang des Schlundtrichters. Mit einer Modifikation des *Gelei — Horváth* schen Versilberungsverfahrens. Vergrösserung 500×

Abb. 5—7. Zilienwellenmuster an der Rücken-, rechten und Bauchseite des Tieres bei einer linksdrehenden geradlinigen Bohrbewegung.

Abb. 8. Das Zilienwellensystem der linksschraubenden nutritorischen Bewegungsform. Zum Teil schon in eine Kegelschwingung übergehend.

Abb. 9. Aus dem Mundfeld nach aussen strudelnde Zilienwellen während einer linksschraubenden Fortbewegung.

Abb. 10—12. Verschieden gerichtete und verteilte Zilienwellen an während der normalen linksschraubenden Fortbewegung erstarrten Tieren.

Abb. 13—20. Verschiedene Varianten der inversen Zilienanordnungen an der Dorsal- bzw. Ventralseite des Tieres.

Tafel II

Abb. 21—26. Invers verlaufende Zilienwellen von verschiedenem Steigwinkel und verschiedener Dichte.

Abb. 27. Optischer Längsschnitt von einem sich in rechtsgewundener Schraubenbahn fortbewegenden Exemplar, mit charakteristischer Stellung der Schwanzzilien.

Abb. 28—36. Lokale Veränderung des Verlaufes und der Verteilung der Zilienwellen an sich rechts- und linksschraubig (Abb. 34—35) fortbewegenden Exemplaren.

Tafel III

Abb. 37—39. Die Wellenanordnung der reinen translatorischen Bewegung.

Abb. 40—42. Zilienwellen während des Zurückschwimmens in rechtsgewundener Schraubenbahn.

Abb. 43. Charakteristische Stellung der Schwanzzilien während des Zurückschwimmens.

Abb. 44—47. Wellenanordnung während der Rotation an Ort und Stelle nach links und rechts (Abb. 47).

Abb. 48—50. Nach rechts ausschlagende Wellenkämme der Peristomalmulde während einer Kegelschwingung.

Tafel IV

Abb. 51—52. Das Wellensystem der Peristommulde während einer einfachen Dorsalwendung.

Abb. 53—54. Dasselbe, mit einer am linken Peristomrand ausgebildeten Randwelle.

Abb. 55—61. Kurze, verschieden gerichtete Wellenkämme an der vorderen Körperhälfte.

Abb. 62—63. Zilienwellenanordnung während einer Kreisbewegung in einer Ebene.

Abb. 64. Dasselbe, an einem von *Didinium* angegriffenen Exemplar.

Tafel V

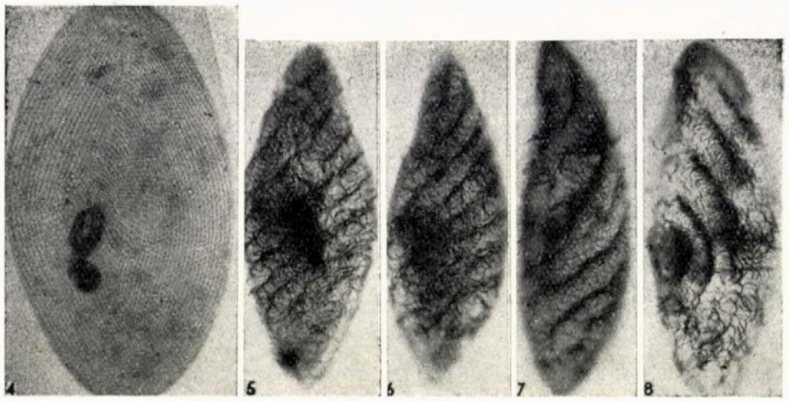
Abb. 65—68. An der ganzen Körperoberfläche synchron und in gleicher Richtung ausschlagende Zilien.

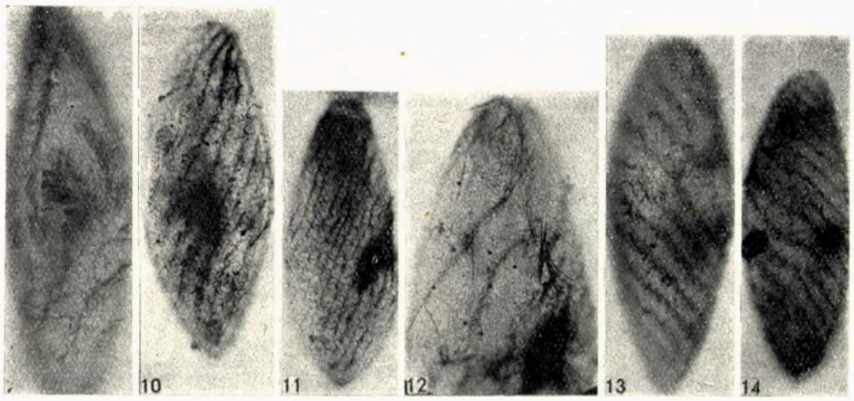
Abb. 69—72. Gestörte, »ungeordnete« Wellenkämme.

Abb. 73—76. Verlauf der Zilienwellen in drei verschiedenen Stadien der Zellteilung (Abb. 73 und 74 zeigen dasselbe Exemplar von der Bauch- bzw. Rückenseite).

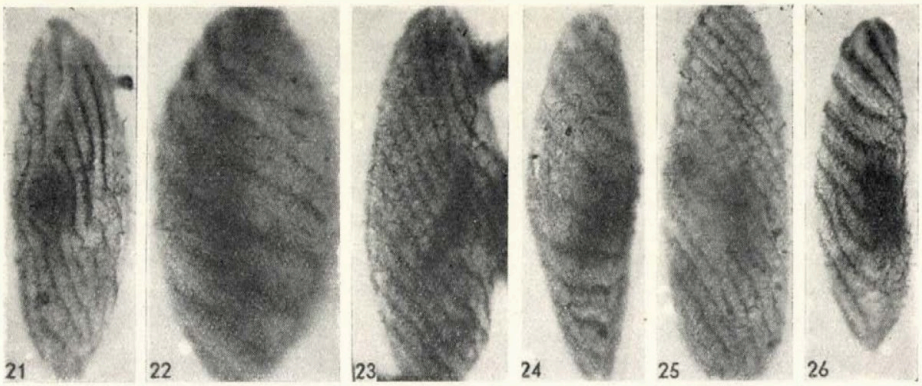
Abb. 77—78. Anordnung der Zilienwellen an konjugierenden Exemplaren.

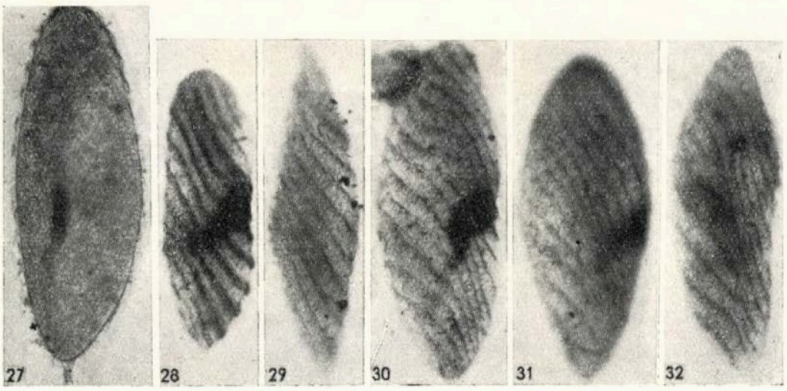
Tafel I



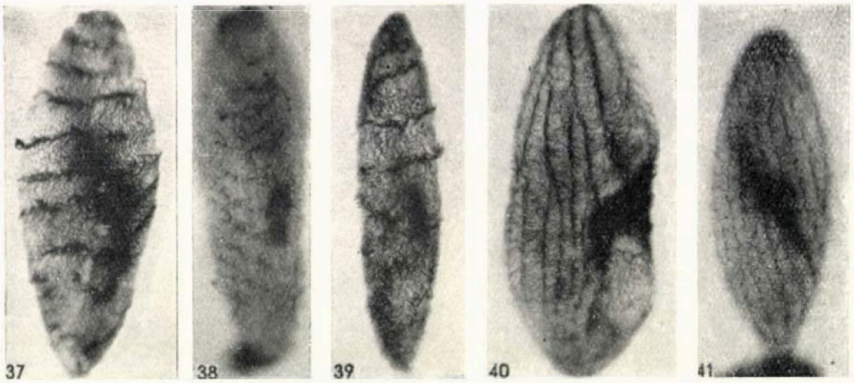


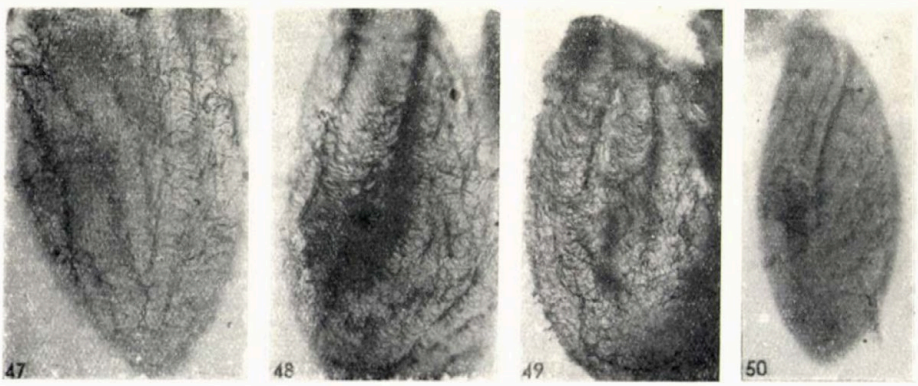
Tafel II



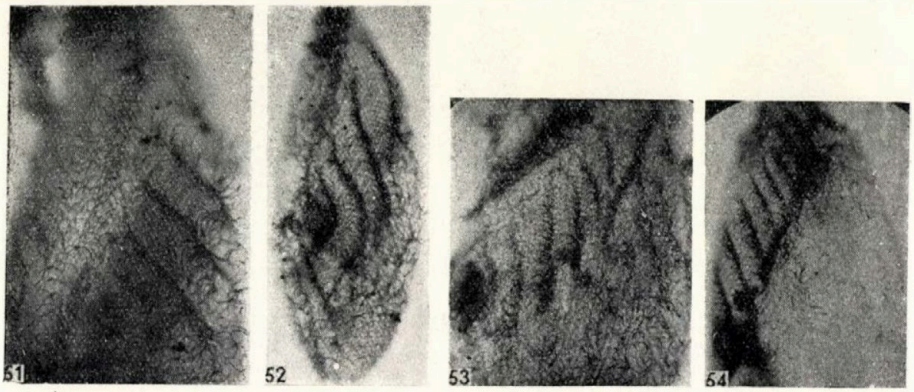


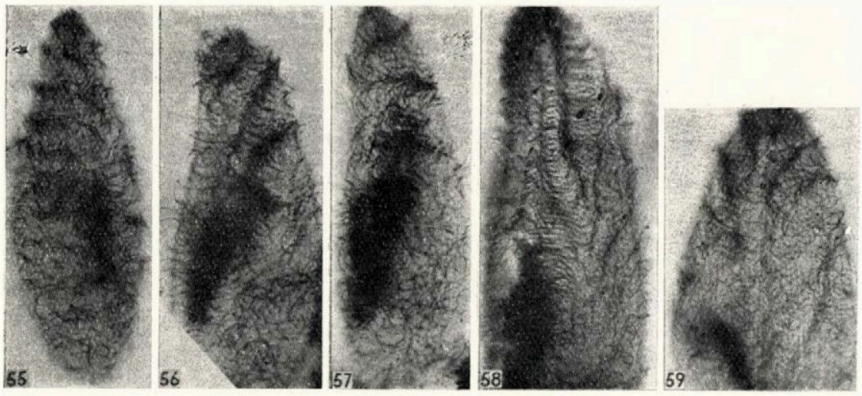
Tafel III



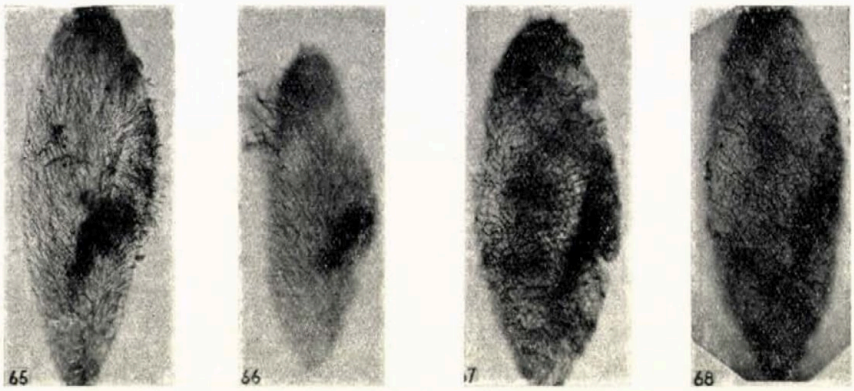


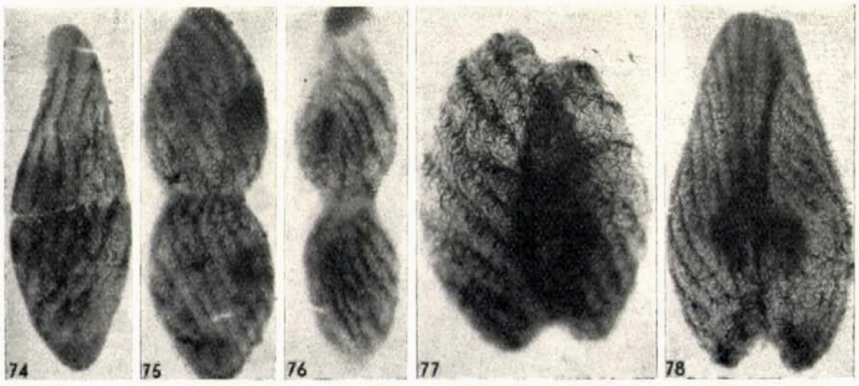
Tafel IV





Tafel V





MIKROORGANISMEN AUS DEM WASSER UNGARISCHER WASSERLEITUNGEN*

Von

PIROSKA TÖRÖK

Staatliches Institut für Volksgesundheitswesen, Budapest

Eingegangen am 10. August 1953

Mit den biologischen Verhältnissen der Wasserleitungswasser begann man sich im Ausland in den siebziger Jahren des vorigen Jahrhunderts zu beschäftigen, während in Ungarn über die Pilze im Budapester Wasser *Istvánffy* [1] im Jahre 1895 und die tierischen Organismen *Török* im Jahre 1935 eine Veröffentlichung erscheinen liess [4]. Seitdem steht das Budapester Wasser unter ständiger biologischer Kontrolle. Die Wasserleitung von Ujpest wurde von diesem Gesichtspunkt im 1934 von *Stiller* [2] untersucht, während die Prüfung der Wasserwerke in der Provinz seit 1951 im Staatlichen Institut für Gesundheitswesen in Gang ist, wo ich ausser der Budapester Wasserleitung 18 Wasserleitungen, und von diesen 10 mit Quellwasserspeisung eingehender untersuchte. Es handelte sich hierbei um die Wasserleitungen von Veszprém, Sümeg, Salgótarján, Balatonalmádi, Balatonfüred, Fonyód-Bélatelep, Tótvázsony, Pápa, Miskolc und Mátraháza.

Bei diesen biologischen Untersuchungen betrug die erhaltene Menge des Filtrats nach Filtrierung grosser Mengen Wassers meist den Bruchteil eines Kubikcentimeters. Anlässlich der mikroskopischen Untersuchung des Sestons fand ich darin leblose organische und anorganische Substanzen, Bakterien und sehr verschiedenartige tierische und pflanzliche Makro- und Mikroorganismen. Die qualitative und quantitative Untersuchung all dieser Bestandteile ist von sehr grosser praktischer Wichtigkeit, da aus deren Anwesenheit, Fehlen oder Menge auf die Qualität des Wassers, den Verunreinigungsgrad, ja auch auf den Ursprung der Verunreinigung geschlossen werden kann. Hierin besteht die Bedeutung dieser Untersuchungen vom Gesichtspunkt des öffentlichen Gesundheitswesens.

Diesmal berichte ich von den im Wasser der untersuchten Wasserleitungen gefundenen Mikroorganismen über Eisenbakterien, Algen und tierische Organismen, und gehe auf die Tripton- sowie auf die durch Kulturen bestimmbaren Bakterien und Pilze nicht ein.

*Vortrag gehalten an dem Mikrobiologischen Kongress, am 6. Januar, 1952.

In den bisher untersuchten Wasserleitungen stellte ich insgesamt 174 Arten von Mikroorganismen fest. Die in den mit Quellwasser gespeisten 10 Wasserleitungswassern der Provinz gefundenen Organismen fasste ich unter Vergleich mit denjenigen, die im Budapester Wasser festgestellt wurden, nach Arten geordnet in systematischer Reihenfolge in einer Tabelle zusammen. Die Kreuze bedeuten das Vorkommen, die Punkte das Auftreten in grösserer Zahl. Bei jeder Wasserleitung ist auch die Temperatur und der pH-Wert vermerkt. Am Ende der Tabelle befindet sich eine Zusammenstellung der Zahl der Arten der in den einzelnen Wasserleitungen vorkommenden pflanzlichen, tierischen und gesamten Mikroorganismen. Aus der Tabelle geht hervor, dass folgende Arten vorkamen :

Pflanzliche Organismen

Schizomycetes	Spaltpilze	7	Arten
Cyanophyceae	Blaualgen	7	«
Diatomeae	Kieselalgen	15	«
Chlorophyceae	Grünalgen	16	«
Conjugatae	Jochalgen	2	«
Fungi (Hypha)	Pilze	1	«
	Insgesamt	48	Arten

Tierische Organismen

Mastigophora	Geisselträger	7	Arten
Rhizopoda	Wurzelfüsser	21	«
Heliozoa	Sonnentierchen	3	«
Ciliata	Wimperinfusorien	20	«
Rotatoria	Rädertiere	31	«
Gastrotricha	Gastrotricha	4	«
Nematoda	Fadenwürmer	18	«
Oligochaeta	Borstenwürmer	1	«
Tardigrada	Bärtierchen	3	«
Crustacea	Krebse	16	«
Insecta	Insekten	2	«
	Insgesamt	126	Arten

In der Tabelle fällt sofort auf, dass sich in den Wasserleitungen infolge der gegenseitigen Beziehungen zwischen Umgebung und Lebewelt zahlreiche Tierchen, d. h. sich auf heterotrophe Art ernährende Mikroorganismen und wenige pflanzliche Mikroorganismen befinden ; wegen Lichtmangel können autotrophe Organismen darin nicht oder höchstens vorübergehend existieren.

Die tierischen Organismen sind hinsichtlich ihrer Ernährung zum grösseren Teil auf Detritus angewiesen, ein Teil derselben, wie die Mastigophoren und einzelne Ciliaten, sind Bakteriophagen, diese nehmen an der Reinigung des Wassers teil, andere, wie die Diglena benannten Rädertiere, sind Raubtiere.

Aus der Tabelle geht ferner hervor, dass die meisten Arten von Organismen im Budapester Wasser vorkommen, und zwar 23 Arten pflanzlicher und 97 Arten tierischer Organismen. Die Ursache hierfür ist in erster Linie der Umstand,

dass die auf das Budapester Wasser bezüglichen Tabellenwerte das Ergebnis jahrelanger systematischer Forschungsarbeit darstellen und sämtliche im Laufe der Jahre gefundenen Organismen enthalten. Unter diesen befinden sich solche, die im Wasser ständig anwesend sind, während andere periodisch vorkommen und wieder andere ausserordentlich selten oder nur in einem Falle erschienen.

Die in der auf die Wasserleitungen der Provinz bezüglichen Tabelle angeführten Ergebnisse ergaben sich aus zwei Untersuchungen, so dass die seltener vorkommenden oder periodisch erscheinenden Organismen in diesen beiden Proben fehlen. Wir verfolgen ja nicht das Ziel, das vollständige floristische und faunistische Bild der Wasserwerke zu ermitteln, sondern suchen die zur hygienischen Beurteilung erforderlichen Indikatoren.

Wenn wir die einzelnen Wasserleitungen gesondert betrachten, so kommen nach der von Budapest die meisten Organismen in den Wasserleitungen von Tótvázsony, Balatonalmádi und Balatonfüred vor. In den übrigen Wasserwerken ist die Zahl der Arten unter 30. So fand ich in den Wasserleitungen der Provinz 30 pflanzliche, 84 tierische, insgesamt 114 Arten von Organismen, von denen 5 pflanzliche und 55 tierische Arten auch in der Budapester Wasserleitung anzutreffen sind. 25 pflanzliche und 29 tierische Arten dagegen kamen nur im Wasser aus der Provinz vor.

Noch interessanter als die systematische Verteilung scheint die Frage, wie sich die gefundenen Organismen in ökologischer Hinsicht verteilen und zu welcher biologischen Indikatorgruppe sie gehören.

Unter den Organismen befinden sich chemische Indikatoren, die die Anwesenheit des für die Wasserleitungen so wichtigen Eisens und Mangans anzeigen. Derartige Organismen sind die Eisen- und Manganbakterien, ferner einzelne Protozoen. Von den 5 Arten Eisenbakterien kommen 3, die Crenothrix polyspora, Gallionella ferruginea und Leptothrix ochracea, sowohl im Budapester als auch in den Wasserleitungswassern der Provinz vor. Crenothrix fusca fand ich nur im Budapester, Leptothrix trichogenes nur im Wasserleitungswasser von Salgótarján. Gallionella ferruginea oxydiert ausschliesslich Eisenverbindungen, Crenothrix fusca hauptsächlich die im Wasser gelösten Manganverbindungen. Der bräunlichschwarze Bodensatz des Budapester Wassers besteht zum grössten Teil aus Massen von Fäden solcher mit Mangansalzen inkrustierter Crenothrix fusca.

In ähnlicher Weise sind zwei Thekamöben, Arcella vulgaris und Centropyxis aculeata, als Eisenindikatoren zu betrachten; sie können in ihrem Gehäuse eine bedeutende Menge Eisen speichern. Beide kamen in der Budapester und in den Wasserleitungen der Provinz vor. Ein anderer chemischer Indikator ist die Lyngbya Martensiana varietas calcaria benannte Blaualge, die im Wasser von Tótvázsony anzutreffen ist und unter die Kalkindikator-Organismen gehört.

Unter den Organismen befinden sich ferner ausgesprochen Grundwasser anzeigende und für Oberflächenwasser charakteristische Organismen. Echte

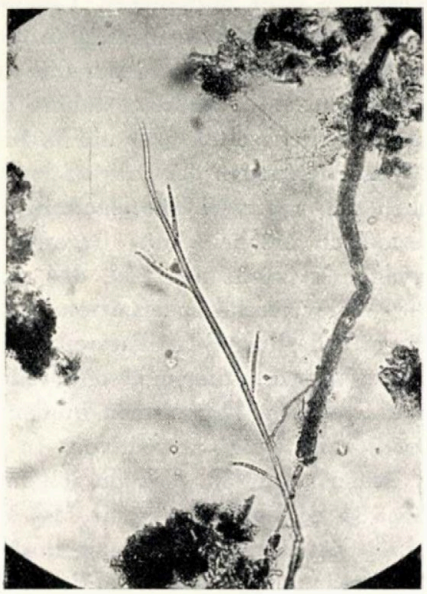


Abb. 1. Crenothrix fusca (Shorler) Dorff, Manganbakterie aus dem Budapester Wasser. Neben den sich verzweigenden jungen Fäden sind die mit Mangansalzen inkrustierten dunklen dicken Fäden sichtbar

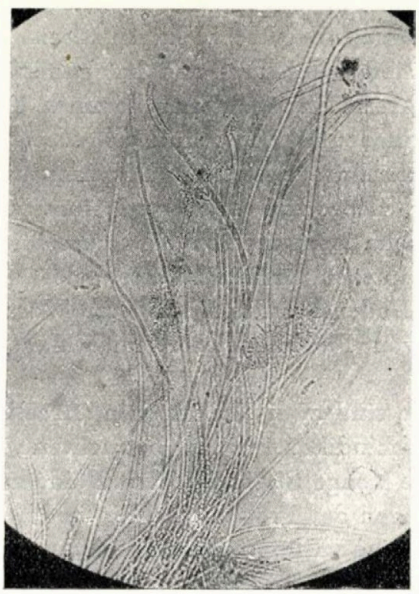


Abb. 2. Crenothrix polyspora Cohn, Eisenbakterie, der charakteristische Eisenindikator der Wasserleitungswasser

Grundwasserorganismen sind die in die Kategorie der Krebse gehörigen 11 Ruderfüsser und die Bathynella Chappuisi. Diese sind an niedrige Temperatur, Lichtmangel, Nahrungsarmut gewohnte kleine, farblose, in geringer Zahl auftretende blinde Organismen. Sie sind unschädlich und leben in reinem Wasser. Die verschiedenen Arten von Ruderfüssern kamen in den Wasserleitungen von Budapest, Balatonalmádi, Balatonfüred, Salgótarján, Tótvázsony und Mátraháza vor. Die Bathynella liess sich ausser im Budapester Wasser auch im Rohrnetz der Wasserleitung von Salgótarján nachweisen. Unter den Krebsen kamen seit

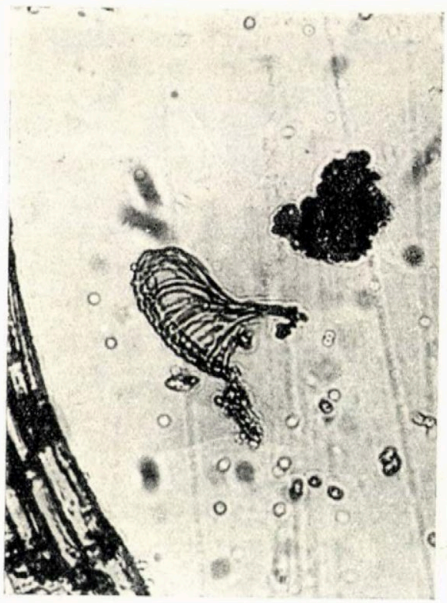


Abb. 3. Leptothrix trichogenes Cholodny, Eisenbakterie von eigenartiger helmförmiger Bildung aus der Wasserleitung von Salgótarján

meiner Veröffentlichung im Jahre 1947 [6] sechs für die Fauna Ungarns neue Krebse vor: im Budapester Wasser die Parastenocaris germanica, Chappuisius inopinus, Nitocrella hirta, Cyclops unisetiger, im Wasserwerk von Mátraháza der Limnocamptus luenensis und im Wasserwerk von Salgótarján und Tótvázsony die Nitocrella omega.

Einige ausgesprochen für Oberflächenwasser charakteristische Grünalgen, wie Eudorina, Gonium, Pediastrum, erscheinen bei hohem Donauwasserstand im Budapester Wasser und zeigen die Möglichkeit einer Verunreinigung mit Oberflächenwasser an. Ulothrix, Microthamnion und andere Algenarten deuten in den mit Karstwasser versehenen Wasserleitungen von Veszprém, Sümeg, Balatonfüred, Tótvázsony, Miskolc und Pápa an, dass durch Gesteinrisse hindurch Oberflächenorganismen ins Wasserwerk gelangen können. Diese Orga-

nismen sind im Wasserwerk von Salgótarján und Mátraháza, deren Wasser aus Glaukonitsand bzw. Andesit-Breccia-Gestein entspringt, nicht vorhanden.

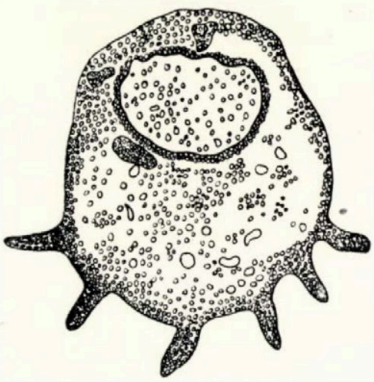


Abb. 4. Centropyxis aculeata Pen. var. oblonga de Flandre, eine in ihrem Gehäuse Eisen speichernde Amoebe

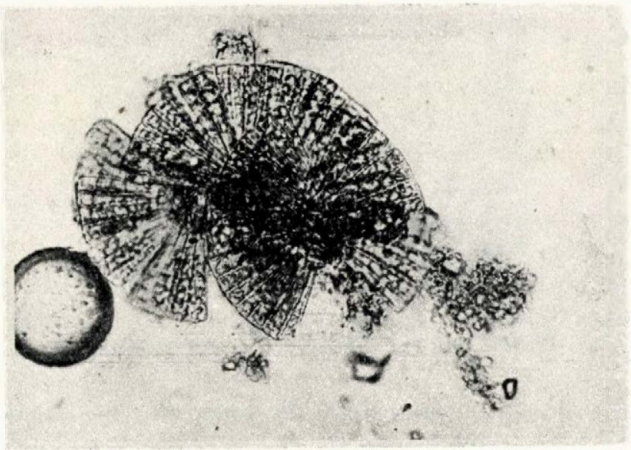


Abb. 5. Meridion circulare Agardh, Kieselalge von oligosaprobem Charakter aus dem Wasserwerk von Miskolc

Die übrigen Organismen kommen eigentlich sämtlich auch im Oberflächenwasser vor.

Das von *Kolkwitz* und *Marsson* für die die Verunreinigungen im Oberflächenwasser anzeigenden Organismen festgestellte und auch zur Beurteilung der Trinkwasserorganismen gebräuchliche Saprobionta-System ist von *Liebmann* revidiert worden. In das in seinem 1950 erschienenen Werk [3] veröffentlichte

Saprobionta-System reiht er neuere charakteristischere Organismen ein und lässt aus seinem System die Organismen, die sich als Ubiquista erwiesen, weg. In dieses revidierte System lassen sich von unseren Organismen nur insgesamt 34 einreihen: 16 Algen, 15 Protozoen und 3 Rotatoria. Von diesen 5 Oligo-, 19 β Meso-, 6 α Meso- und 4 α Meso-Polysaprobien. Die übrigen Organismen kommen in diesem System nicht vor. In der Tabelle ist neben den Arten auch der Zugehörigkeitsgrad zum Saprobionta-System angegeben.

Abb. 6. Cyphoderia margaritacea Ehr. in jeder Wasserleitung vorkommende pantosaprobe Thekamoebe

Die Rhizopoden sind typische Bewohner des Brunnenwasserschlamms. Diese, wie ein Teil der Ciliaten, die Rädertiere sowie die Fadenwürmer und Bärtierchen, sind pantosaprobe Lebewesen und gehören nach *Liebmann* nicht in das revidierte System, ebensowenig der Gammarus, den ich in der Wasserleitung von Tótvázsony fand und der bisher als oligosaprob betrachtet wurde. Alle diese Mikroorganismen sind auf irgendeine Weise in die Wasserwerke gelangt, und obwohl sie dort ihre ursprünglichen Lebensbedingungen nicht vorfanden, waren sie doch fähig, ihr Leben fortzusetzen, doch sind sie nunmehr nicht von saprobem Charakter und nicht schädlich; kommen sie jedoch in grösserer Zahl vor, zeugen sie dafür, dass im Wasserwerk ein Fehler vorliegen muss. Auch die echten Grundwasserorganismen kommen im Saprobionta-System nicht vor, doch könnten sie auf Grund ihrer Lebensbedingungen in die oligosaprobe Stufe eingeteilt werden.

Wenn wir nunmehr die einzelnen Wasserleitungen vom Gesichtspunkt der Saprobionten betrachten, so sehen wir, dass sich von den 120 Organismen des Budapester Wassers 21 in das revidierte Saprobionta-System einreihen lassen : zwei oligosaprobe Rotatorien, 12 β mesosaprobe und 6 α mesosaprobe Algen, Protozoen und Rotatorien. Die 12 für das unterirdische Wasser charak-

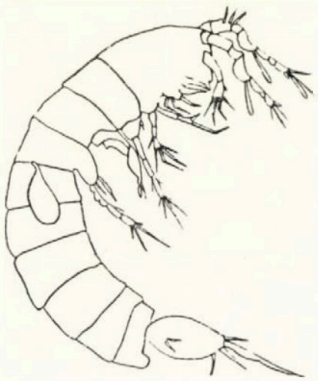


Abb. 7. Parastenocaris germanica Kiefer, für unterirdisches Wasser charakteristischer Krebs aus dem Budapester Wasser

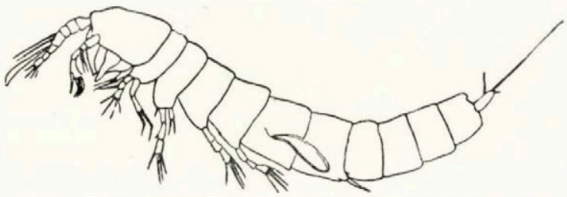


Abb. 8. Chappuisius inopinus Kiefer, ein für Ungarns Fauna neuer, für unterirdisches Wasser charakteristischer Krebs

teristischen Krebse sind oligosaprober Natur. Die β mesosaproben Algen sind keine ständigen Bewohner des Wassers, sondern erscheinen nur im Frühjahr und Herbst. Von den Protozoen kommen insgesamt nur 2 β mesosaprobe häufiger und in grösserer Zahl vor. Die übrigen 87 Organismen, d. h. ein grosser Teil der Mikroorganismen, sind von pantosaprobem oder von saprophilem Charakter. In den Wasserwerken von Veszprém, Sümeg, Balatonfüred, Pápa und Mátraháza sind die pantosaproben Organismen im Übergewicht. Einige Saprobionta-Arten kommen vereinzelt vor.

Von den 27 Organismen im Wasserwerk von Salgótarján sind 2 Krebse, Parastenocaris pannonicus und Nitocrella omega, sowie ein Rotatoria von oligosaprobem Charakter. Unter den 6 mesosaproben Protozoen deutet der α mesosaprobe Charakter der Bodo saltans und Glaucoma pyriformis auf eine geringfügige Verunreinigung des Wassers hin. Deren Ursache stellten wir in der unzweck-

mässigen Bedeckung der Quellfassung im Wasserwerk und im völligen Fehlen eines Schutzgebietes fest.

Abb. 9. Hoplolaimus aquaticus Mic. In den Wasserleitungen ziemlich häufiger Fadenwurm

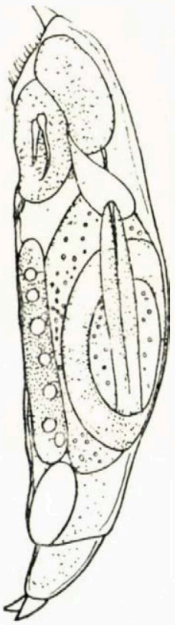


Abb. 10. Diglena mustela Milne, Rädertier (Raubtier) mit einer Nematoda im Magen, aus dem Wasserwerk von Pápa

Dasselbe gilt auch für das Wasserwerk von Balatonalmádi.

Unter den 27 Organismen im Wasserwerk von Fonyód-Bélatelep befinden sich zwar nur 3 α und 1 β Mesosaprob, doch kommen die α Mesosaprobien,

besonders Rotifer vulgaris, in derart grosser Zahl vor, dass das Wasser offensichtlich verunreinigt ist. Bei der Suche nach den Ursachen für das häufige Vorkommen der Organismen stellte es sich heraus, dass sich im Sammelbrunnen und -becken eine grosse Menge Eisenhydroxyd, Eisenbakterien und Zoogloea angesammelt hatte, in der die Organismen einen günstigen Zufluchts- und Brutplatz fanden. In diesem Falle deuteten die Organismen darauf hin, dass Reinigung und Instandhaltung des Wasserwerkes ungenügend waren. Im übrigen war das Wasser auch durch die in grosser Zahl erschienenen Collembolen unappetitlich. Die Verunreinigung des Wassers liess sich auch durch den nicht entsprechenden bakteriologischen Befund nachweisen.

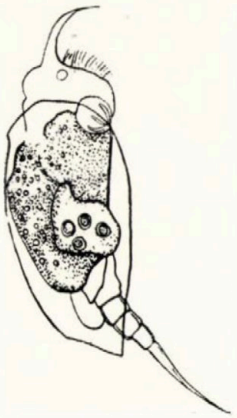


Abb. 11. Colurella adriatica Ehr. Pantosaprobes Rädertier, das in mehreren Wasserleitungen vorkommt

In qualitativer Beziehung ergab das Wasserwerk der Gemeinde Tótvázsony das ungünstigste Bild. Im Gegensatz zu den anderen Wasserleitungen traten pantosaprobe Organismen nur vereinzelt auf. Von 51 Arten Organismen waren 15 Saprobionta, 2 Oligo-, 7 β Meso-, 4 α Meso-, 2 α Meso-Polysaprobien. 7 von diesen kamen in grösserer Zahl vor. Die Quellfassungen des Karstwasser verbrauchenden Wasserwerkes befanden sich in ausserordentlich vernachlässigtem Zustand ohne Schutzgebiet und waren tierischen und menschlichen Verunreinigungen ausgesetzt. Beim Hochheben des Deckels einer der Quellstuben fand ich darin ein 10 cm dickes, die gesamte Wasseroberfläche einnehmendes Wurzelgeflecht, in dem nach dem Herausfischen mit einer Harke Massen von Insekten und anderen Organismen anzutreffen waren.

Im Wasserwerk von Miskolc dominiert der oligosaprobe Meridion, ferner kommen 2 oligo- und 2 β mesosaprobe Organismen vereinzelt vor.

Ausser qualitativen habe ich auch quantitative Untersuchungen durchgeführt. Die Zahl der auf 1 m^3 bezogenen Mikroorganismen in den einzelnen Wasserwerken geht aus einem Graphikon hervor, das das Ergebnis von zwei

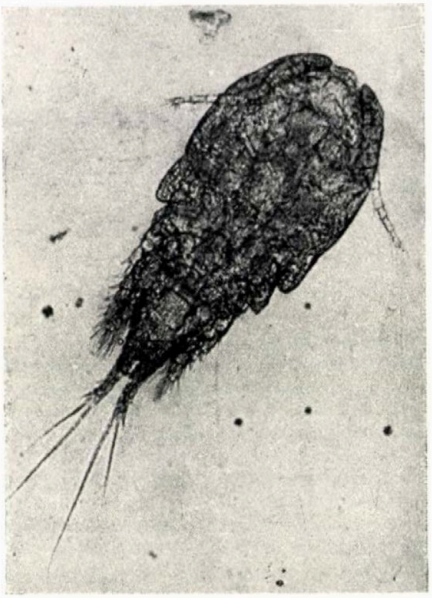


Abb. 12. Cyclops languidoides subspec. clandestinus Kiefer, die charakteristische Copepoda aus der Wasserleitung von Balatonalmádi

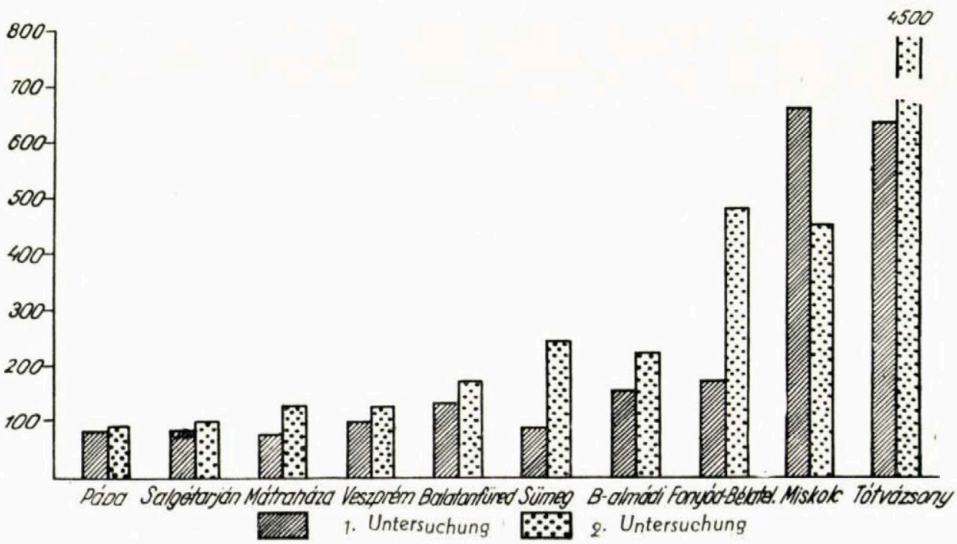


Abb. 13. Zahl der Mikroorganismen in den ungarischen Wasserleitungen je m^3 Wasser

Die Photographien sind Mikroaufnahmen nach Originalpräparaten. Die Zeichnungen sind von der Verfasserin angefertigt

Untersuchungen aufweist. Bei Untersuchungen in der ersten Jahreshälfte ist die Zahl der Mikroorganismen geringer als in der zweiten Jahreshälfte. Dies stimmt mit den Ergebnissen in Budapest überein, wo ebenfalls in den Herbstmonaten die Zahl der Organismen ansteigt. Bei einem Blick auf die Ergebnisse in den einzelnen Wasserwerken sehen wir, dass im Wasserwerk von Pápa und Salgótarján die Zahl der Organismen weniger als 100 beträgt, während in dem auch qualitativ als schlecht befundenen Wasserwerk von Tótvázsony 4 500 und im Wasserwerk von Fonyód-Bélatelep 600 Organismen angetroffen wurden.

ZUSAMMENFASSUNG

Aus den ungarischen Wasserleitungen konnten 48 pflanzliche und 126 tierische, insgesamt 174 Arten von Organismen bestimmt werden. Von diesen stammen 23 pflanzliche und 97 tierische, insgesamt 120 Organismen aus dem Budapester, 30 pflanzliche und 84 tierische, insgesamt 114 Organismen aus Wassern in der Provinz. 5 pflanzliche und 55 tierische Organismen kamen sowohl in Budapest als auch in der Provinz, 25 pflanzliche und 29 tierische nur in der Provinz vor. Seit meiner Veröffentlichung im Jahre 1947 konnten 6 für Ungarns Fauna neue Krebse nachgewiesen werden. Unter den Organismen befinden sich für Eisen, Mangan und Kalk charakteristische chemische Indikatoren sowie für echtes Grundwasser und Oberflächenwasser kennzeichnende biologische Indikatoren. Vom ökologischen Gesichtspunkt waren die Grundwasserorganismen von oligosaprobem, die Mehrzahl der aus Oberflächenwasser stammenden von pantosaprobem Charakter, ausserdem kamen 5 oligo-, 19 β mesoprobe, 6 α mesoprobe und 4 α mesopolysaprobe Organismen vor. Auf Grund der quantitativen Untersuchung enthält das auch in qualitativer Hinsicht als schlecht befundene Wasser von Tótvázsony die meisten Organismen. Die geringste Zahl von Organismen wurde im Wasserwerk von Pápa festgestellt.

Aus den vorkommenden Organismen ergaben sich Hinweise auf das Einströmen von Oberflächenwasser in das Wasserwerk, auf Verunreinigungsmöglichkeiten des Karstwassers, auf Fehler im Wasserwerk bzw. auf Verunreinigungen, die durch ungenügende Instandhaltung zustande gekommen waren. Gesundheitsschädliche Organismen wurden nicht beobachtet.

LITERATUR

1. *Istvánffy Gy.:* Die Vegetation der Budapester Wasserleitung. Botan. Centralbl. (1895) Bd. LXI.

2. *Stiller J.:* Biologische Untersuchungen eines Wasserwerkes in der Umgebung von Budapest. »Kleine Mitteilungen« für die Mitglieder des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene (1937).

3. *Liebmann H.:* Handbuch der Frischwasser- und Abwasserbiologie (1950).

4. *Török P.:* A budapesti vízvezetéki víz szüredékének faunája. (Die Fauna im Filtrat des Budapester Wasserleitungswassers.) Matematikai és Természettudományi Értesítő (1935) Bd. LIII.

5. *Török P.:* A budapesti víz biológiai vizsgálata. (Die biologische Untersuchung des Budapester Wassers.) Természettudományi Közlöny, Ergänzungsheft (1937).

6. *Török P.:* The occurrence of Bathynella in the Budapest aqueduct. Fragmenta Faunistica Hungarica (1947).

МИКРООРГАНИЗМЫ ИЗ ВОДОПРОВОДНОЙ ВОДЫ В ВЕНГРИИ

П. Тэрэк

Резюме

Автор подверг микробиологическому исследованию 10 водопроводов обеспечиваемых ключевой водой. Микроорганизмы обнаруженные в этих водопроводах сравнялись с микроорганизмами обнаруженными в течении нескольких лет в воде будапештского водопровода. Результаты изложены в прилагаемой таблице. Крестиками обозначено наличие микроорганизмов в воде, а точками появление микроорганизмов в большом

количестве. Для каждого водопровода указана и температура воды и pH. В конце таблицы обозначено число растительных и животных микроорганизмов, обнаруженных в отдельных водопроводах. В водопроводной воде в Венгрии автором обнаружено 48 растительных и 126 животных микроорганизмов, т. е. всего 174. Из этого числа в воде будапештского водопровода обнаружено 23 растительных и 97 животных микроорганизмов, т. е. всего 120, а в водопроводной воде в провинции обнаружено 30 растительных и 84 животных, т. е. всего 114 микроорганизмов. Из этого числа 5 растительных и 55 животных микроорганизмов обнаружены и в воде будапештского водопровода, тогда как остальных 25 растительных и 29 животных микроорганизмов обнаружено только в провинции. С 1947 года автором обнаружено еще 6 видов рачков, являющихся новыми экземплярами в животном мире Венгрии.

Среди организмов находятся химические индикаторы характерные для железа, марганца и извести и биологические индикаторы характерные для подпочвенной и грунтовой воды. С экологической точки зрения в подпочвенной воде обнаружены микроорганизмы из группы олигосапробов. В поверхностной воде подавляющее большинство микроорганизмов представляют пантосапробы ; кроме этого обнаружено 5 олигосапробов, 19β мезосапробов, 6α мезосапробов и 4α мезо-полисапробов.

Результаты исследований отражены в графиконе, из которого видно, что вода в Тотважоне, которая и после качественного исследования охарактеризована как плохая, содержит самое большое количество микроорганизмов. В водохранилище города Папа обнаружено самое незначительное количество микроорганизмов.

Наличие микроорганизмов в водопроводной воде указывает на возможность поступления грунтовой воды в водохранилище, на загрязнение карстной воды, на загрязнение воды в водохранилище ввиду неправильного его обслуживания. В водопроводной роде не обнаружены микроорганизмы оказывающие вредное действие на здоровье человека.

Tabella I

Mikroorganismen aus dem Wasser ungarischer Wasserleitungen

Name der Wasserleitung	Budapest	Veszprém	Sümeg	Salgótarján	Balatonalmádi	Balatonfüred	Fonyód-Bt.	Tótvázsony	Pápa	Miskole	M.-h ósza
Wassertemperatur in C°	7-18	12	16	11	12	13	13,5	12	15,5	11,5	10
pH	7,3	7,2	7,1	7,0	7,2	7,0	7,2	7,3	7,1	6,9	7,0
I. Pflanzliche Mikroorganismen											
Schizomycetes. 7.											
1. Crenothrix fusca (Shorler) Dorff	●	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2. Crenothrix polyspora Cohn	●	–	–	●	●	+	+	+	+	–	●
3. Gallionella ferruginea Ehrbg.	●	–	–	●	–	+	●	–	–	–	–
4. Leptothrix ochracea Kützing	+	–	+	●	+	+	–	–	–	+	–
5. Leptothrix trichogenes Cholodny	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–
6. Spirillum	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–
7. Zoogloea	●	–	–	–	–	+	–	–	+	–	–
Cyanophyceae. 8.											
8. Dactylococcopsis rhaphidioides Hansgirg	–	–	–	–	–	–	–	–	●	–	–
9. Lyngbya limnetica Lemm.	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–
10. Lyngbya Martenziana Menegh var. calcaria Tilden	–	–	–	–	–	–	–	●	–	–	–
11. Merismopedia punctata Meyen	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–
12. Oscillatoria Lauterborni Schmidler	–	–	–	–	–	–	–	●	–	–	–
13. Oscillatoria subtilissima Kützing.	–	–	–	–	+	–	–	●	–	+	–
14. Oscillatoria tenuis Agardh *αm*	–	–	–	–	–	–	–	●	–	–	–
15. Spirulina Jenneri Geitler	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Diatomeae. 15.											
16. Asterinella formosa Hassal *βm*	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
17. Cymatopleura solea (Breb) w. Schmith. *βm*	–	–	–	–	–	–	–	+	–	+	–
18. Diploneis sp.	–	–	–	–	–	–	–	+	–	+	–
19. Fragillaria crotonensis (Kitton.) *βm*	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
20. Gomphonema olivaceum (Lyngbye) Kütz.	–	–	–	–	–	–	–	●	–	–	–
21. Hantzschia amphyoxys (Ehr.) Grun. *αm*	–	–	–	–	+	–	–	+	–	–	–
22. Melosira varians C. a. Agardh.	–	–	–	–	–	–	–	–	–	●	–

23. Meridion circulare Agardh.	0	–	–	–	–	–	+	–	●	–	●	–
24. Navicula rhinchocephala. Kütz.	βm	–	–	–	–	+	–	–	●	–	+	–
25. Nitzschia linearis W. Schmith.	0	–	–	–	–	–	–	–	●	–	–	–
26. Rhoicosphaenia curvata (Kütz.) Grun.	βm	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–
27. Stauroneis sp.		–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–
28. Surirella sp.		–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–
29. Synedra ulna (Nitsch) Ehr.	βm	–	–	–	–	–	–	–	+	–	+	–
30. Tabellaria fenestrata (Lyngb) Ktz.	βm	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Chlorophyceae. 15.												
31. Bumileria sicula Borzi?		–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–
32. Eudorina elegans Ehr.		+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
33. Gonium pectorale O. F. Müller.	αm	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
34. Microthamnion Kützingianum Nägeli	βm	–	–	–	–	–	●	–	–	–	–	–
35. Pandorina morum (Müller) Bory		+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
36. Pediastrum boryanum (Turp) Meneng.	βm	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
37. Pediastrum duplex Meyen var. asperum Al. Braun.		+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
38. Pediastrum duplex Meyen var. reticulatum Lagerheim		+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
39. Pediastrum tetras (Ehr.) Ralfs.		+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
40. Pediastrum tetras var. excisum Rabenhorst		+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
41. Scenodesmus obliquus (Turpin) Kützing		+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
42. Scenodesmus opoliensis P. Richter		+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
43. Scenodesmus quadricauda (Turpin) Breb.	βm	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
44. Ulothrix tenerrima Kütz.		–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–
45. Ulothrix zonata Kütz.	0	–	+	+	–	+	–	–	–	–	–	–
Conjugatae. 2.												
46. Closterium sp.		+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
47. Spyrogyra sp.		+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Fungi												
48. Hyphen		+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	●
II. Tierische Mikroorganismen												
Mastigophora. 7.												
1. Bodo caudatus Duj.		–	–	–	–	+	–	●	+	–	+	+
2. Bodo globosus Stein		+	–	–	–	+	–	+	+	–	–	–
3. Bodo saltans Ehrbg.	αm	+	–	–	●	+	–	●	●	–	–	–

Name der Wasserleitung		Budapest	Veszprém	Sümeg	Salgótarján	Balatonalmádi	Balatonfüred	Fonyód Bt.	Tótvázsony	Pápa	Miskolc	M.-háza
4. Monas sp.		–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–
5. Mastigamoeba buetschlii Klebs		–	–	–	–	–	–	●	–	–	–	–
6. Pleuromonas jaculans Perty		–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–
7. Rhinchomonas nasuta Klebs		–	–	–	–	–	–	–	●	–	+	–
***Rhizopoda.* 21.**												
8. Amoeba proteus Pallas	*βm*	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
9. Amoeba radiosa Duj.	*βm*	+	–	–	–	+	+	–	–	–	–	–
10. Amoeba verrucosa Ehr.	*βm*	●	–	–	+	+	–	–	+	+	–	–
11. Limax typ. amoeba		●	–	–	–	●	●	●	+	–	–	●
12. Arcella vulgaris Ehr.		+	●	–	+	+	–	+	+	+	–	+
13. Centropyxis aculeata De Flandre		●	+	●	+	+	+	–	–	–	+	+
14. Centropyxis discoides Penard		+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
15. Cochilopodium bilimbosum Ehr.		+	–	+	–	●	–	–	–	–	–	–
16. Cyphoderia margaritacea Ehr.		+	+	●	●	+	+	–	+	●	●	●
17. Difflugia constricta Ehr.		●	●	+	●	●	+	–	+	+	+	+
18. Difflugia corona Wallich		–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
19. Difflugia globulosa Duj.		+	–	–	+	–	+	–	–	–	●	–
20. Difflugia pyriformis Perty		–	+	●	–	–	+	–	+	+	+	+
21. Euglypha alveolata Duj.	*βm*	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	●
22. Euglypha ciliata Penard		+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	+
23. Euglypha laevis Perty		+	+	–	–	●	●	–	+	●	+	●
24. Nebela collaris Leidy		+	+	–	–	–	+	–	–	+	–	●
25. Phryganella haemisphaerica Pen.		–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–
26. Quadrula simmetrica Schulze		+	–	+	–	–	+	–	–	–	–	●
27. Trinema enchelys Ehr.		+	+	+	–	+	●	–	+	●	+	+
28. Trinema lineare Pen.		+	+	+	–	●	+	–	+	–	+	+
***Heliozoa.* 3.**												
29. Acanthocystis spinifera Greef		+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
30. Actinophrys vesiculata Pen.		+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
31. Rhaphidiophrys pallida Schulze		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
***Ciliophora.* 20.**												
32. Aspidisca lynceus Ehr.	*βm*	+	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–
33. Chilodonella cucullulus Müller.	*βm*	●	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–
34. Chilodonella dentata Fouque		+	+	–	+	●	+	●	+	●	–	–

35. Chilodonella uncinata Ehr.	*αm*	–	–	–	–	+	–	–	●	–	–	–
36. Cinetochilum margaritaceum Perty		+	–	+	+	+	–	+	+	+	–	–
37. Colpoda steini Maup.		–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–
38. Cyclidium glaucoma Ehr.		–	–	–	–	–	–	–	+	–	+	–
39. Cothurnia cristallina Ehr.		–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
40. Euplotes affinis f. tricirrata Kahl.		+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
41. Euplotes charon Müller.	*βm*	–	–	–	+	+	+	–	–	–	–	–
42. Glaucoma pyriformis Ehr.	*αm—p.*	+	+	–	●	●	–	+	+	+	–	–
43. Glaucoma scintillans Ehr.	*βm—p.*	–	–	–	–	–	–	–	●	–	–	–
44. Halteria grandinella Müller	*βm*	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–
45. Lionotus fasciola Ehr.	*βm*	+	–	–	–	●	–	–	–	+	–	–
46. Paramaecium sp.		–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–
47. Trachelophyllum chilense Bürger		+	–	●	–	●	–	+	–	–	–	–
48. Vorticella convallaria L.	*αm*	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
49. Vorticella microstoma Ehr.	*αm—p.*	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
50. Vorticella Schwärmer		–	+	–	+	●	–	–	–	–	–	–
51. Zoothamnium affine Stein.		+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Rotatoria. 31.												
52. Anurea aculeata Ehr.		+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
53. Ascomorpha ecaudis Perty		+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
54. Callidina bidens Gosse		●	+	●	●	–	–	–	+	●	+	–
55. Callidina lata Bryce		–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–
56. Colurella adriatica Ehr.		●	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–
57. Colurella colurus Ehr.		●	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–
58. Colurella obtusa Gosse		●	–	+	–	+	–	+	–	–	–	–
59. Colurella uncinata Müller		+	–	–	–	+	–	+	–	–	+	–
60. Colurella sp.		+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
61. Diaschiza gracilis Ehr.		+	+	–	–	+	–	–	–	–	–	–
62. Diglena circinator Gosse		+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
63. Diglena grandis Ehr.		+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
64. Diglena mustela Milne		+	–	–	–	+	–	–	–	●	–	–
65. Distyla flexilis Gosse		●	–	●	–	+	+	–	–	–	+	–
66. Distyla gissensis Eckstein		–	+	–	–	–	–	●	–	–	–	+
67. Euchlanis dilatata Ehr.		+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
68. Furcularia forficula Ehr.		+	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–
69. Lophocaris salpina Ehr.		●	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
70. Metopidia ovalis Müller		+	–	+	●	+	+	–	+	–	–	–
71. Monostyla arcuata Bryce		+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	●
72. Monostyla closterocerca Schmarda		+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
73. Monostyla lunaris Ehr.	0—*βm*	+	–	–	+	+	–	–	–	–	+	–

Name der Wasserleitung	Budapest	Veszprém	Sümeg	Salgótarján	Balatonalmádi	Balatonfüred	Fonyód-Bt.	Tótvázsony	Pápa	Miskolc	M.-bánya
74. Monostyla pyriformis Daday	+	+	–	–	–	–	–	–	+	–	–
75. Monostyla Ströszneri Török	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
76. Monostyla Vargae Török	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
77. Notholca striata Ehr 0	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
78. Philodina citrina Ehr	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
79. Philodina macrostyla Ehr	●	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
80. Philodina roseola Ehr	+	–	–	–	+	–	–	–	+	–	–
81. Proales minima Weber	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
82. Rotifer vulgaris Sehr *βm—p.*	+	–	–	–	–	–	●	–	–	–	–
Gastrotricha. 4.											
83. Chaetonotus larus Müller	●	–	–	–	–	+	+	+	–	–	–
84. Chaetonotus macrochaetus Zelinka	+	–	–	–	+	–	–	–	–	–	+
85. Chaetonotus maximus Ehr.	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
86. Lepidoderma sp.	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–
Nematoda. 18.											
87. Actinolaimus macrolaimus De Man	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–
88. Cyatholaimus terricola De Man	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
89. Diploscapter coronata Cobb	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
90. Dorylaimus carteri Bastian	+	–	–	–	+	–	+	–	–	–	–
91. Dorylaimus filiformis Bastian	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
92. Ethmolaimus pratensis De Man	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
93. Hoplolaimus aquaticus Mic.	+	+	–	–	+	+	+	+	–	–	–
94. Monhystera similis Bütschli	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
95. Monhystera vulgaris De Man	+	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–
96. Mononchus macrostoma Bastian	+	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–
97. Plectus cirratus Mic.	+	+	–	–	+	–	–	+	–	–	–
98. Plectus geophilus De Man	+	–	–	–	+	+	–	–	–	–	–
99. Prismatolaimus dolichurus De Man	+	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–
100. Prismatolaimus intermedius De Man	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
101. Rhabdolaimus terrestris De Man	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
102. Trilobus gracilis Bastian	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
103. Tripyla setifera Bütschli	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
104. Nematoda juvenilis Std.	+	+	+	●	+	–	–	–	●	–	+

Oligochaeta												
105. Enchytraeus sp.		−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−
Tardigrada. 3.												
106. Hypsibius schaudinni Richters		+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
107. Macrobiotus ampullaceus Thul.		+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
108. Macrobiotus macronyx Duj.		−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Crustacea. 16.												
109. Cyclops languidoides S. sp. clandestinus Kiefer		+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
110. Cyclops unisetiger Graeter		+	−	−	−	●	−	−	−	−	−	−
111. Cyclops sp.		−	+	−	−	−	●	−	−	−	+	−
112. Chappuisius inopinus Kiefer		+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+
113. Limnocamptus luenensis (Schmeil) Chappuis		−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
114. Nitocrella hirta Chappuis		+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
115. Nitocrella omega Hertzog		−	−	−	+	−	−	−	+	−	−	−
116. Parastenocaris budapestiensis Török		+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
117. Parastenocaris Entzii Török		+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
118. Parastenocaris germanica Kiefer		+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
119. Parastenocaris pannonicus Török		+	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−
120. Parastenocaris similis Török		+	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−
121. Nauplius		+	●	●	●	●	●	−	●	+	+	+
122. Bathynella Chappuisi Delachaux		+	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−
123. Alona costata Sars		+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−
124. Gammarus pulex L.		−	−	−	−	−	−	−	●	−	−	−
Insecta. 2.												
125. Pholsomia sp.		−	−	−	−	−	−	●	−	−	−	−
126. Orchesella sp.		−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−
Pflanzliche Mikroorganismen insgesamt	48	23	2	3	4	7	10	3	18	4	10	2
Tierische Mikroorganismen insgesamt	126	97	25	20	23	41	25	24	33	22	19	21
Organismen insgesamt	174	120	37	23	27	48	35	27	51	26	29	23

DIE ZÜCHTUNG DES TSCHECHOSLOWAKISCHEN ENCEPHALITISVIRUS IN GEWEBEKULTUREN

Von
M. PINTÉR und I. BÉLÁDI

Institut für Mikrobiologie der Medizinischen Universität, Szeged

Eingegangen am 12. August 1953

Im Laufe der in der Tschechoslowakei im Jahre 1948 aufgetretenen Encephalitisepidemie wurden von *Hloucal* und *Gallia* [1] mehrere Virusstämme isoliert. Das epidemiologische Bild war ähnlich dem der russischen Frühjahr-Sommerencephalitis, was auch durch die Isolierung des Virus aus Zecken bekräftigt wurde [2]. Im Laufe der Untersuchung der Antigenstruktur des Virus wurde eine sehr starke serologische Ähnlichkeit zwischen dem neuen Virus und das Virus der russischen Frühjahr-Sommerencephalitis sowie das Louping-ill-Virus festgestellt [3]. Auf Grund dieser Ergebnisse kann das Virus der tschechoslowakischen Encephalitis in die Gruppe der Zeckenencephalitisviren eingereiht werden. Nach der tschechoslowakischen Mitteilung wurden auch in Ungarn Untersuchungen vorgenommen, wobei man gelegentlich einer kleineren Epidemie in der Nähe von Tatabánya im Blutserum von Patienten das Auftreten einer grossen Menge von Immunstoff beobachten konnte, durch welches das tschechoslowakische Virus neutralisiert wurde [4].

Die bereits früher bekannten Typen der Zeckenencephalitisviren, das Virus der russischen Frühjahr-Sommerencephalitis bzw. der Louping-ill-Krankheit, wurden erfolgreich in embryonalen Hühnergewebekulturen gezüchtet [5, 6]. Die vorliegende Abhandlung soll über die Züchtung des neuen Zeckenencephalitisvirus und über sein Verhalten in Gewebekulturen berichten.

Methodik

Im Laufe der durchgeführten Versuche wurde der Ri-Stamm des tschechoslowakischen Encephalitisvirus verwendet, der von *Dr. Gallia* (Prag) liebenswürdigerweise zur Verfügung gestellt wurde. Das Virus wurde in Mäusepassagen überimpft und in einem 50%igen Glyzerin-Puffergemisch bei —20° C im Eisschrank gehalten.

Zur Züchtung des Virus gelangten Maitlandkulturen zur Verwendung, die auf folgende Weise hergestellt wurden. Aus dem Gemisch von drei Teilen Simms-X_6-Lösung und einem Teil Rinderserum-Ultrafiltrat wurden 4 ml in

einen Erlenmeyerkolben von 100 ml eingemessen, wobei die Nährlösung 10 Einheiten Penicillin und 10 γ Streptomycin je ml enthielt. Aus den zerstückelten und gewaschenen Geweben von neuen-zwölftägigen Hühnerembryonen wurden ungefähr 0,2 g in einen Kolben überführt. Die Infektion der ersten Kultur erfolgte mit 0,1 ml einer 10%igen Suspension von Mäusegehirnen, die mit dem Virus infiziert waren. Die Kulturpassagen wurden alle 72 Stunden mit je 0,4 ml der Zuchtlösung durchgeführt und die Kulturen auf 37° C gehalten.

Zur Titrierung des Virus gelangten 10fache Verdünnungen zur Verwendung der in ihrer Nährlösung homogenisierten Kultur. Die Titrierung des Virus wurde mit drei Methoden ausprobiert. Zuerst wurden gleich grosse Mäusegruppen mit je 0,03 ml der Verdünnungen der Virussuspension intrazerebral beimpft. Die hierzu benutzten braunen Mäuse waren 4 bis 6 Wochen alt. Der Titer des Virus wurde in DL_{50}-Werten ausgedrückt, die nach der Formel von *Reed* und *Muench* [7] berechnet wurden. Die Wertbestimmung des Virus wurde auch durch Infizierung von bebrüteten Eiern durchgeführt. Hierbei wurden 0,2 ml der Verdünnungen der Virussuspension nach dem Verfahren von *Cox* über den Luftsack in den Dottersack der 6—8 Tage alten Eier geimpft. Die Feststellung des Titers erfolgte nach der vorigen Methode aus dem Verhältnis der abgestorbenen Embryonen. Schliesslich wurde versucht, das Virus durch Beobachtung des Wachstums der in Hängetropfen explantierten Gewebsstücke zu titrieren. Hierzu wurde das Verfahren, das *Cserey-Pechány* und Mitarbeiter [8] zur Titrierung des Virus der Aujeszkyschen Krankheit ausgearbeitet hatten, in folgender Weise angewandt. In Röhrchen von 10 mm Durchmesser wurden je 2 ml Nährlösung eingefüllt. Aus dem Virus wurde nun eine Verdünnungsserie hergestellt und danach in jedes Röhrchen 6—8 Stückchen zerkleinerter Herzen von 10—12 Tage alten Hühnerembryonen gegeben. Nach 72 Stunden wurden die Herzmuskelstückchen in Hängetropfen aus Hühnerplasma und Embryonenextrakt explantiert. Die Explantate befanden sich dann 96 Stunden hindurch bei 37° C, wobei ihr Wachstum täglich kontrolliert wurde.

Ergebnisse

Die gebrauchten Virusstämme wurden mehrere Male vor den Gewebekulturversuchen in Mäusen titriert. Die ermittelten DL_{50}-Werte schwankten in jedem Falle zwischen 10^{-6} und 10^{-8}. Der Titer der zur Infektion der ersten Gewebekultur dienenden Virussuspension betrug $10^{-6{\cdot}23}$. Das Virus wurde über 72 Passagen gezüchtet und dabei mehrmals mit verschiedenen Methoden titriert. Nach den Ergebnissen der in Mäusen durchgeführten Messungen zeigte der Titer des gezüchteten Virus gewisse Schwankungen, wobei er jedoch kein einziges Mal einen Wert von 10^{-4} übertraf; er war also immer wesentlich niedriger als der Titer des Mäusepassagevirus. Die Resultate der in Mäusen durchgeführten Titrierungen sind aus Tabelle I ersichtlich.

Tabelle I

Titrierung des in embryonalen Hühnerkulturen gezüchteten tschechoslowakischen Encephalitisvirus in Mäusen

Passage Nr.	Virusverdünnung					DL_{50}
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	
5.	4/4	4/4	0/4	0/4	0/4	$10^{-2,5}$
15.	4/4	3/4	0/4	0/4	0/4	$10^{-2,3}$
22.	4/4	4/4	0/4	0/4	0/4	$10^{-2,5}$
30.	4/4	2/4	0/4	0/4	0/4	$10^{-2,0}$
59.	4/4	3/4	3/4	2/4	1/4	$10^{-3,7}$
69.	4/4	4/4	2/4	1/4	0/4	$10^{-3,2}$

Zähler = Zahl der eingegangenen Mäuse
Nenner = Zahl der beimpften Mäuse

Dieselbe Erscheinung konnte bei der Züchtung des Virus aus einer neuen Kulturserie beobachtet werden. Die mit dem aus Gewebekulturen gezüchteten Virus beimpften Mäuse gingen unter den für die Infektion charakteristischen Symptomen einer schweren Nervensystemstörung ein, doch zog sich die Inkubationszeit an Stelle der normalen 4—5 Tage über 7—12 Tage hin.

Zur Feststellung, ob sich die Senkung des Virustiters infolge einer Adaptation an das Hühnergewebe nur auf Mäuse bezieht, wurde die Titrierung durch Infektion von bebrüteten Hühnereiern versucht. Die durch Impfung in den Dottersack infizierten 6—8 Tage alten Embryonen gingen infolge der Wirkung des Virus vorschriftsmässig zwischen dem 3. und dem 6. Tage nach der Infizierung ein, so dass die Titrierung des Virus auch mit dieser Methode brauchbare Resultate ergab. Der Virustiter betrug auch bei Anwendung dieser Methode einen Wert unter 10^{-4},analog wie bei der parallel in Mäusen durchgeführten Titrierung (vgl. Tabelle II). Die infolge der Infektion eingegangenen Embryonen

Tabelle II

Titrierung des in Hühnerembryonalkulturen gezüchteten tschechoslowakischen Encephalitisvirus in Mäusen und in bebrüteten Hühnereiern

Passage Nr.	Mäuse					DL_{50}	Befruchtete Hühnereier					DL_{50}
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	
59.	4/4	3/4	2/4	2/4	1/4	$10^{-3,7}$	4/4	4/4	4/4	1/4	0/4	$10^{-3,6}$
69.	4/4	4/4	2/4	1/4	0/4	$10^{-3,2}$	4/4	4/4	2/4	0/4	0/4	$10^{-3,0}$

Zähler = Zahl der eingegangenen Mäuse bzw. Embryonen
Nenner = Zahl der beimpften Mäuse bzw. Embryonen

zeigten die auch in Verbindung mit anderen Encephalitisviren beobachteten charakteristischen Veränderungen (Hämorrhagie, Ödem).

Die Titrierung des Virus wurde auch mit explantierten embryonalen Herzstückchen versucht. Auf die Anwesenheit des Virus wurde aus dem Auftreten oder Ausbleiben des Wachstums der Fibroblasten geschlossen. Auf Grund der in zahlreichen Fällen durchgeführten Titrierungen konnte die Feststellung gemacht werden, dass eine genaue Ermittlung des Virustiters mit dieser Methode nicht möglich ist. In einer Virusverdünnung von 1 : 10 traten in mehreren Fällen keine Fibroblasten auf, während ein andermal das Virus auf das Wachstum der Fibroblasten anscheinend keinen Einfluss ausübte. Die bei zahlreichen Viren zu beobachtende und für die Viruswirkung als charakteristisch angesehene Zerstörung und Desintegration der Fibroblasten wurde in keinem einzigen Falle wahrgenommen.

Um zu entscheiden, ob die Virusvermehrung im Herzmuskelgewebe möglich ist oder ob die Vermehrung an andere Gewebe gebunden ist, wurde die Züchtung in Kulturen vorgenommen, die entweder nur Herzmuskelstückchen oder nur Gehirngewebe enthielten. Das Virus wurde in beiderlei Kulturen über 15 Passagen gezüchtet. Der Titer sowohl des in Gehirngewebe als auch in Herzmuskeln gezüchteten Virus ergab bei Bestimmung durch Mäusetitrierung vollständig identische Werte [10^{-2}). Der Einfluss der so gezüchteten Viren auf das Wachstum der Explantate war, ähnlich wie im vorhergehenden Versuch, ganz unregelmässig.

Diskussion

Auf Grund der hier beschriebenen Versuche kann das Virus der tschechoslowakischen Encephalitis, ähnlich wie die übrigen Encephalitisviren ohne Schwierigkeiten an embryonales Hühnergewebe adaptiert und darin gut gezüchtet werden. Das gezüchtete Virus weist aber einen wesentlich niedrigeren Titer auf, als das Mäusepassagevirus. Dies ist deshalb überraschend, weil das Virus der serologisch und pathologisch sehr nahestehenden russischen Frühjahr-Sommerencephalitis auch in Gewebekulturen einen hohen Titer erreicht [9]. Eine ähnliche Titerabnahme bei der Züchtung wurde auch beim Virus der St. Louisschen Encephalitis beobachtet [10], während das Virus der equinen Encephalomyelitis auch in Gewebekulturen eine starke Vermehrung zeigt [11]. Die Titerabnahme wurde auch mit Titrierungen in bebrüteten Hühnereiern nachgewiesen. Dies bedeutet, dass man es mit einer tatsächlichen Titersenkung des Virus zu tun hat. Die pathogene Wirkung auf die Hühnerembryonen kann als identisch mit der Wirkung der anderen Encephalitisviren, in erster Linie des Louping-ill-Virus betrachtet werden [12].

Es gelang nicht, das Virus mit Herzmuskel-Gewebsexplantaten zu titrieren, trotzdem sich das Virus auch im Herzmuskel gut vermehrte. Diese Eigenschaft

stimmt wieder mit dem Verhalten des St. Louisschen Virus überein, im Gegensatz zum Virus der equinen Encephalomyelitis, welches auch mit der obigen Methode gut titrierbar ist [11]. Über die Wertbestimmung des Virus der russischen Frühjahr-Sommerencephalitis mit Gewebsexplantaten standen keine Angaben zur Verfügung.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Es gelang, das Virus der tschechoslowakischen Encephalitis in embryonalen Hühnergewebekulturen von Maitlandschem Typus zu züchten und über 72 Passagen zu vermehren.

2. Der Titer des gezüchteten Virus war niedriger als der Titer des Mäusepassagevirus; er schwankte zwischen 10^{-2} und 10^{-4}.

3. Es gelang nicht, das gezüchtete Virus mit explantierten Herzmuskelstückchen von Hühnerembryonen zu titrieren, dies war nur mit Mäusen und bebrüteten Eiern möglich.

LITERATUR

1. *Hloucal, L., Gallia, F.:* Sbornyk lékarsky **51**, 352 (1949).
2. *Rampas, J., Gallia, F.:* Čas. Lék. Česk. **88**, 1179 (1949).
3. *Edward, D. G.:* Brit. J. Exp. Path. **31**, 515 (1950).
4. *Fornosi, F., Molnár, E.:* Orv. Hetilap 993 (1952).
5. *Smorodintsev, A. A.:* Arch. Ges. Virusf. **I**, 468 (1940).
6. *Rivers, T. M., Ward, S. M.:* Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. **30**, 1300 (1933).
7. *Reed, L. J., Muench, M.:* Am. J. Hyg. **27**, 493 (1938).
8. *Cserey-Pechány, E., Béládi, I., Ivánovics, G.:* Acta Physiol. Hung. **2**, 229 (1951).
9. *Friend, Ch.:* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **78**, 150 (1950).
10. *Harrison, R. W., Moore, E.:* Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. **35**, 359 (1936—37).
11. *Huang, C. M.:* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **51**, 396 (1942).
12. *Edward, D. G.:* Brit, J. Exp. Path. **28**, 237 (1947).

РАЗВЕДЕНИЕ ВИРУСА ЧЕХОСЛОВАЦКОГО ЭНЦЕФАЛИТА В ТКАНЕВОЙ КУЛЬТУРЕ

М. Пинтер и И. Белады

Резюме

1. Авторам удалось культивировать вирус чехословацкого энцефалита в культурэ зародыша цыпленка (тканевая культура типа Майтланд) и провести 72-кратний пассаж вируса,

2. Титр вируса культивированного таким образом был ниже титра вируса полученного пассажом у мышей и равнялся с 10^{-2} до 10^{-4},

3. Титрование культивированного вируса в культуре ткани сердечной мышцы цыпленка не удалось; положительный результат получен только в экспериментах на мышах и зародышах цыпленка.

SEKTIONSEINLEITENDE VORLESUNGEN AUF DEM I. KONGRESS DER UNGARISCHEN MIKROBIOLOGISCHEN GESELLSCHAFT

BUDAPEST, 6–12. I. 1952

SIEBEN JAHRE UNGARISCHER MEDIZINISCHER BAKTERIOLOGIE UND IMMUNOLOGIE (1945—1951)

K. RAUSS

Institut für Mikrobiologie der Medizinischen Universität, Pécs

Als der Organisationsausschuss des Mikrobiologischen Kongresses mich mit der ehrenvollen Aufgabe betraute, kurz über die von ungarischen Verfassern über bakteriologische und immunologische Themen seit der Befreiung veröffentlichten Arbeiten zu berichten, ahnte ich nicht, was für eine gewaltige Aufgabe ich übernommen hatte. Schon bei der Sammlung der diesbezüglichen Angaben stellte es sich heraus, dass das Ergebnis der Arbeiten der ungarischen Mikrobiologen ein weit grösseres Material darstellte, als erwartet wurde. Bei der Sichtung dieses Materials trat dann der volle Umfang der aufzuarbeitenden Angaben zutage. Eine besondere Schwierigkeit bei der Sammlung der Angaben bedeutete der Umstand, dass keine einzige der zur Verfügung stehenden ungarischen Zeitschriften gefunden wurde, die nicht eine sich auf diesen Gegenstand beziehende Arbeit enthalten hätte. Auch diese Zersplitterung zeigt die Heimatlosigkeit der ungarischen Mikrobiologie, das Fehlen einer ungarischen mikrobiologischen Zeitschrift. Die gesammelten 120 Aufsätze — die nur einen Teil des Gebietes der Mikrobiologie erfassen — und das riesige Diskussionsmaterial des Mikrobiologischen Kongresses sind ein weiterer sprechender Beweis für die Notwendigkeit einer Fachzeitschrift. Mit der Äusserung meiner diesbezüglichen Meinung bin ich vielleicht vom Gegenstand etwas abgewichen, doch will ich durch das Vorausschicken des Gesagten die Bedeutung des Problems unterstreichen.

Bei der Sammlung der Angaben stand mir Institutsdemonstrator *G. Kelemen* hilfreich zur Seite. Um eine möglichst vollständige Aufarbeitung der Angaben sicherzustellen, wandte ich mich an alle Organe, die sich berufsmässig mit mikrobiologischen Forschungen beschäftigen, mit der Bitte, ein Verzeichnis der seit der Befreiung erschienenen Aufsätze sowie die vorhandenen Sonderabdrucke zu überlassen. Für die freundlicherweise gewährte wertvolle Unterstützung will ich gleichfalls eingangs meinen Dank aussprechen; ohne diese wären zahlreiche Arbeiten meiner Aufmerksamkeit entgangen, doch ist es trotz der sorgfältigen Vorarbeiten noch immer möglich, dass einige Abhandlungen unberücksichtigt blieben.

Bevor ich mich dem engeren Thema zuwende, dürfte es nicht uninteressant sein zu vernehmen, wie gross die Produktion in den einzelnen Jahren war.

In den Jahren von 1945 bis 1947 wurden jährlich im Durchschnitt 5 Arbeiten publiziert, im Jahre 1948 stieg die Zahl der Veröffentlichungen bereits über 20 und im Jahre 1951 übertraf die Zahl der Abhandlungen, wenn man auch die Kongressvorträge in Rechnung stellt, sogar 60. In diesem ansteigenden Graphikon fällt der Beginn des Anstieges mit dem Beginn der neuen Kulturpolitik der Regierung, mit dem Beginn der die Forschungsarbeiten leitenden und unterstützenden Tätigkeit des Wissenschaftlichen Rates und später der reorganisierten Akademie der Wissenschaften zusammen. Diese in Ungarn bisher noch nie gesehene Anerkennung und Unterstützung der Forschungsarbeit kam natürlich auch im Aufschwung der ungarischen mikrobiologischen Forschung zum Ausdruck.

Meinen Bericht versuchte ich derweise übersichtlich zu gestalten, dass ich das gesammelte Material in Gruppen gliederte, in denen angefangen von den Methoden und den morphologischen Forschungen bis zu den spezialisierten Abschnitten, sowie von den theoretischen bis zu den praktischen Fragen sozusagen sämtliche wichtigeren Kapitel der medizinischen Bakteriologie und Immunologie vertreten sind. Eine Grenzziehung war häufig sehr schwierig, und wenn ich an einigen Stellen diese Grenzen überschritt, so geschah dies deswegen, weil die Schönheit und der Wert der betreffenden Arbeit zu einer solchen »Grenzverletzung« verlockten. Ich ersuche deshalb um Nachsicht, sowie auch für den vielenorts gebrauchten Telegrammstil, der im Interesse einer möglichst raschen Übersicht über das gewaltige Material eine zwingende Notwendigkeit war.

*

Einen der bedeutendsten Meilensteine in der Entwicklung unserer *Nährbodentechnik* stellte die Ausarbeitung der *Eörsi*schen hefehaltigen Nährböden dar [1]. Die Anwendung billiger Energie- und Vitaminquellen führte zur Überwindung zahlreicher technischer Schwierigkeiten. Die *Vitéz*schen Sojamehl-, Fleischpulver- [2] und Blutplasma-Soja- [3] Nährböden weisen ebenfalls auf die Möglichkeiten billiger Rohstoffquellen hin. *Serény* [4] arbeitete eine Methode zur richtigen Feststellung der Agarkonzentration aus und *Szára* [5] untersuchte die Herstellung von aminosäurereichen Kaseinhydrolysaten mit der papierchromatographischen Methode.

Für unsere *mikrobiologische Methodik* bedeutete die von *Takátsy* [6] ausgearbeitete Verdünnungstechnik einen grossen Gewinn. *Nógrády* [7, 8] trug durch eine neuartige automatische Pipette und einen die Zerstreuung des infektiösen Materials verhindernden Bunsenbrenner zur Erleichterung der mikrobiologischen Arbeit bei. Die Vorteile der klinischen Bestimmung der Empfindlichkeit der Krankheitserreger gegenüber Antibiotika mit einem einfachen Verfahren erhellen aus den Untersuchungen von *Szabó* [9], *Frank* [10] sowie von *Mráz* und *Ujváry* [11]. *Pálóczy* [12] probierte ein vom Laboratorium

unabhängiges, rasches Züchtungsverfahren für Diptheriebazillen mit gutem Erfolg aus.

Über *morphologische Untersuchungen* ist in der ungarischen Literatur nur wenig zu finden. *Nógrády* [13] untersuchte die Struktur von K. pneumoniae im Fluoreszenzmikroskop, während *Szabó* [14] die Intensität der Gram-Färbung der der Wirkung des Penicillins ausgesetzten Mikroben in den verschiedenen Wachstumsphasen mit dem Kolorimeter prüfte.

Mit einzelnen Fragen des *Bakterienmetabolismus* befassen sich mehrere Mitteilungen, deren Themen auf den verschiedensten Gebieten liegen. Nach *Novák* [15] wird die Fermentationsfähigkeit von Sh. dysenteriae durch Antitoxin gehemmt. *Iványovics* [16] definierte auf vitaminfreiem Kaseinhydrolysat-Grundnährboden genau den Anspruch des Wachstumsfaktors der in die A-, B- und C-Gruppe gehörenden Streptokokken. Pantothensäure ist ständig notwendig, doch beanspruchten einzelne Stämme ausserdem auch andere Vitamine und Aminosäuren. *Simkovics* [17] und Mitarbeiter beobachteten, dass penicillinresistente Staphylokokkenstämme eine höhere Dehydrogenaseaktivität aufweisen. *Nikodémusz* und Mitarbeiter [18] stellten fest, dass die Bakterien die meisten Alkohole — wenn diese nur eine niedrige Konzentration haben — als Kohlehydratquelle zu benutzen imstande sind, wobei aber der diesbezügliche Mechanismus noch unbekannt ist. *Nikodémusz* [19] gelang es, aus einer Erkrankung ein ungewohntes Cl. tetani zu züchten, das Kohlehydrat abbaute und Dextrose sowie Maltose fermentierte. *Serény* und *Szita* [20] untersuchten das Ureumabbauvermögen der Darmbakterien und bestätigten jene vom diagnostischen Gesichtspunkt wichtige Feststellung, dass der Ureumabbau eine charakteristische Eigenschaft der Proteusgruppe ist. Die Hydrolyse tritt auf einem geeigneten Nährboden bereits innerhalb 6 Stunden ein.

Unter den auf die *Desinfektionsmittel* bezüglichen Untersuchungen ragen zwei Abhandlungen von *Alföldy* hervor. In der ersten [21] untersuchte er die desinfizierende Wirkung des Torfes und gelangte hierbei zur Feststellung, dass der Torf tatsächlich eine bakterizide Fähigkeit besitzt, was im wesentlichen als eine Wirkung der Huminsäure angesehen werden darf. Die zweite Mitteilung [22] bezieht sich auf die Untersuchung des »Merfen« genannten Desinfektionsmittels, das ungefähr 1200mal wirksamer ist als Karbolsäure. *Vitéz* und *Ács* [23] schlagen zur Desinfektion von Tuberkulosebazillen enthaltenden Ausscheidungen den Gebrauch von chlorhaltigen Verbindungen vor.

Untersuchungen über *Antigene* wurden von *Joó* und *Tarnóczy* [24, 25] an Typhusbazillensuspensionen durchgeführt, die mit Ultraschall bestrahlt wurden. Die Veränderung der Agglutinierbarkeit der bestrahlten Bakterien sowie die Toxizität und Flockungsfähigkeit des sterilen Filtrats weisen darauf hin, dass der Ultraschall das somatische Antigen des Typhusbazillus mechanisch von der Zelle ablöst. *Gál* und Mitarbeiter [26] beobachteten die Detoxizierung des Diphtherietoxins bei Röntgenbestrahlung. Cystein hemmte den Prozess,

wodurch zum Ausdruck gebracht wurde, dass der im Laufe der Ionisierung freigewordene Wasserstoff für die Detoxizierung verantwortlich ist.

Auch die Zahl der sich mit *Antitoxinen* befassenden Arbeiten ist nicht gross. *Kemény* und *Illés* [27] arbeiteten durch eine Modifizierung der Lezitho-Vitellinprobe für die Wertbestimmung der B. perfringens-Seren eine einfachere und billigere Methode aus, als es die Mäusemethode ist. Nicht weniger wesentlich ist auch die Feststellung von *Szathmáry* [28] dass die anaphylaktogene Wirkung der mit fermentativer Behandlung konzentrierten Seren weit geringer ist, als die der unbehandelten Seren.

Eine neuartige Erklärung für die Physiologie der *Infektion und Immunität* wurde vom verstorbenen Professor *Mansfeld* [29] gegeben. Ohne die Kenntnis der Lehren Pawlows und der wegweisenden Ergebnisse des Nervismus erschien die angenommene Rolle des Nervensystems im Lichte der verschiedenen Versuchsangaben ungewiss ; dies konnte allerdings ohne Anwendung der dialektischen Methoden auch gar nicht anders der Fall sein. Über die Steigerung der Immunstoffproduktion durch das Rindenhormon berichtet *Láng* [30]. Diese auch in der ausländischen Literatur erwähnte Erscheinung erfuhr in seinen Versuchen eine neuerliche Bestätigung.

Im Vordergrund des Interesses steht die Frage der *Lues-Seroreaktionen.* Unter den diesbezüglichen Arbeiten ragt das vereinfachte Schnellreaktionsverfahren von *Mandula* [31] hervor, durch welches die Möglichkeit für eine Durchführung von Lues-Massenuntersuchungen geschaffen wurde. Auf Mikroreaktionsmethoden bezügliche Angaben enthalten auch die Arbeiten von *Somos* [32, 33, 34]. Mit der Frage der Spezifizität beschäftigen sich *Somos* und Mitarbeiter [35, 36] sowie *Berger* [37]. Ersterer lenkt die Aufmerksamkeit auf eine vorsichtige Beurteilung der Hilfsreaktionen und auf die Beobachtung der klinischen Symptome, während letzterer mit der Verfeinerung der Kephalin-Reaginreaktion die Anzahl der unspezifischen Reaktionen zu vermindern versucht. *Plank* [38] schliesst aus den von ihm durchgeführten Untersuchungen, dass der Ursprung des Komplements mit dem RES zusammenhängt, weil durch dessen Reizung ein Einfluss auf den Titer ausgeübt werden kann. *Garai* [39] sowie *Káldor* [40] und ihre Mitarbeiter studierten die bei der Wassermannreaktion vorkommenden Immunkörper, oder richtiger den Charakter der Reaktion. *Káldor* ist der Auffassung, dass die Reagine sich gleichförmig auf die Albumin- und Globulinfraktionen des Blutserums verteilen, während *Garai* der Ansicht ist, dass diese zu den Globulinen gehören — weil die Komplementbindungsfähigkeit des Serums nach Behandlung mit Ultraschall keine Veränderungen aufweist —, so dass sie als wahre Immunglobuline betrachtet werden können. *Káldor* [41, 42] sowie *Somos* [42, 43] befassten sich auch mit der quantitativen Wassermannreaktion, u. zw. vom Gesichtspunkt der Empfindlichkeit der Reaktion, des klinischen Zustandes des Patienten und der Bedeutung der Eigenhemmung.

Auch aus dem Themenkreis der *Anaphylaxie* bzw. der *Allergie* wurde die Literatur durch wertvolle Beiträge bereichert. Das Histaminazoproteinpräparat von *Went* und *Kesztyüs* [45] zeigte in serologischen Reaktionen eine Histaminspezifität und gewährte in aktiven sowie in passiven Immunisierungsversuchen Schutz gegen die toxische Wirkung des Histamins. Nicht weniger interessant sind auch die von *Went*, *Kesztyüs* und *Adler* [46, 47] mit Novocain-Azoprotein durchgeführten Untersuchungen. Dieses Präparat zeigt mit den mit Novocain in chemischer Verwandtschaft stehenden Anästhetika eine serologische Beziehung, was darauf hinweist, dass beim Menschen — selbst wenn die Sensibilisierung nur mit einem einzigen Glied der Gruppe erfolgt — die Überempfindlichkeit gegenüber der ganzen Paraaminobenzoesäure-Serie bestehen kann. *Haynal* [48] berichtete über eine bemerkenswerte Beobachtung; infolge der Wirkung eines anaphylaktischen Schockes, der im Menschen durch Gabe von Heilserum hervorgerufen wurde, trat eine günstige Veränderung der Symptome mehrerer Infektionskrankheiten ein. Die Richtigkeit dieser Beobachtung wird durch den Umstand bekräftigt, dass der anaphylaktische Schock den Agglutinationstiter von Kaninchen erhöhte. *Kemény* und Mitarbeiter [49] machten die Wahrnehmung, dass Thymektomie den anaphylaktischen Schock in Tieren nicht beeinflusst, während die Symptome durch Kastrierung gemildert werden. Schliesslich findet man auch Angaben von *Rauss* und *Szilárd* [50], dass die chronische Cholezystitis als eine Allergie gegenüber B. coli betrachtet werden kann.

Auf dem Gebiete der *Blutgruppenforschung* verdienen die von *Backhausz* und Mitarbeitern im Zusammenhang mit dem Rh-Faktor durchgeführten Untersuchungen die grösste Beachtung. Es gelang ihnen, ein entsprechendes diagnostisches Serum herzustellen [51], dann stellten sie fest, dass es unter der ungarischen Bevölkerung in einer Häufigkeit von 16—17% Rh-negative Personen gibt [52]. In Fällen von Erythroblastose sammelten sie interessante anamnestische und diagnostische Angaben [53] und machten schliesslich die Feststellung, dass bei dieser Krankheit auch die opsonisierende Wirkung des Rh-Antigens zur Zerstörung der Erythrozyten beiträgt [54]. In diesem Themenkreis fanden wir noch eine Arbeit, welche über die durch die Kälteagglutinine verursachten Irrtümer bei der Bestimmung der Blutgruppe handelt [55], während eine andere Arbeit [56] über die isoantigenen Eigenschaften von Blutkörperchen berichtet, die der gleichen Art, aber einer anderen Gruppe angehören.

Mit der Frage des *Scharlachs* befassen sich mehrere Abhandlungen. *Ujhelyi* und *Darvas* [57] ziehen aus dem Ergebnis von Kreuzversuchen, die mit dem Standardimpfstoff und dem Impfstoff aus dem Toxin von frisch gezüchteten Stämmen, sowie mit Dickschen Proben durchgeführt wurden, die Folgerung, dass die jetzt herrschende Epidemie sich auch vom immunbiologischen Gesichtspunkt von den früheren unterscheidet. *Mihályfi* [58] erörtert die Bedeutung von Schutzmassnahmen gegenüber Streptokokkenträgern und bringt einerseits Angaben über die guten Ergebnisse der Penicillinbehandlung und anderer-

seits über die Häufigkeit der Kreuzinfektionen im Spital. *Ormay* [59] befasst sich auf Grund der neuesten Angaben der sowjetischen Verfasser mit den Problemen der Ätiologie und der Prophylaxe von Scharlach.

Ein Verfahren, das günstigere Ergebnisse als bisher in der Züchtung der Krankheitserreger von *Endocarditis lenta* zeitigt, wird von *Szabó* [60] beschrieben. *Szmuk* und *Parádi* [61] hingegen schildern eine serologische Methode, die auf der qualitativen Veränderung des Serumglobulins beruht und eine Diagnose der Endocarditis lenta ermöglicht.

Zur Kultivierung von *Gonokokken* wurde von *Alföldy* [62] ein Nährboden ausgearbeitet, der ein 85%iges Ergebnis gewährleistet. Für den wichtigsten Bestandteil dieses Ascitesnährbodens hält er gekochtes Blut bzw. dessen Gehalt an X-Faktor. In einer anderen Abhandlung teilt *Alföldy* [63] die Beobachtung mit, dass die Penicillinresistenz der Gonokokken eine genuine Eigenschaft ist, die sich also nicht erst während der Penicillinbehandlung ausgebildet hat. Zur Feststellung des Aufhörens der Infektiosität der Gonokokken zieht *Patkós* [64] den Züchtungsversuch der mikroskopischen Untersuchung vor. *Jobst* [65] beschreibt ein vitales Färbeverfahren, mit dessen Hilfe er beobachtete, dass im Organismus nur die phagozytierten Kokken zugrunde gehen.

Mit der Züchtung des *Tuberkulosebazillus* beschäftigen sich mehrere Aufsätze. *Iványovics* [66] modifizierte den bei chemotherapeutischen Untersuchungen von Tuberkulose unentbehrlichen Dubosschen Nährboden und vereinfachte dadurch dessen Herstellung ganz beträchtlich. Er verwendete an Stelle der nicht erhältlichen Albuminfraktion des Bovinserums eine leicht herstellbare Albuminlösung, während er das schwer beschaffbare Asparagin durch bernsteinsaures Natrium ersetzte. In mehreren Mitteilungen berichtet *Szabó* über den Fortschritt in der bakteriologischen Diagnostik der Tuberkulose. Unter den verschiedenen bekannten Nährböden liessen sich die besten Ergebnisse bei gemeinsamer Verwendung des Šulaschen und Löwensteinschen Nährbodens erzielen, während bei den zur Materialentnahme üblichen Methoden der Šulasche Larynxtampon die besten Resultate lieferte [67, 68]. Trotz negativem Röntgenbefund kann der Tuberkulosebazillus auch oft aus der Magenwaschflüssigkeit gezüchtet werden. Der Ursprung dieses Bazillus ist in diesem Fall nach der Feststellung von *Szabó* [69] hämatogen, da in einem Material, das aus dem Magen von intravenös infizierten Kaninchen genommen wurde, der Krankheitserreger bereits eine halbe Stunde nach der Infektion auftauchte. *Kovács* und *Földes* [70] schildern eine Mikrokultivationsmethode, die nach ihnen für Orientierungszwecke geeignet ist. Mit dieser Methode lässt sich der Tuberkulosebazillus schon nach 5—10 Tagen auch in jenen Fällen nachweisen, wo die direkte Färbung ein negatives Resultat ergab. Hier soll auch die Mitteilung von *Sipos* [71] erwähnt werden, laut welcher das eiweissfreie Filtrat der mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellten Suspension von Tuberkulose-

bazillen die Eigenschaften von Tuberkulin besitzt, wobei seine Spezifität die des Tuberkulins übertrifft.

Den heutigen Stand der *spezifischen Prävention der Tuberkulose*, ihre theoretischen und praktischen Probleme behandelt *Havas* [72, 73, 74] in mehreren Abhandlungen. Eine interessante diesbezügliche Beobachtung ist, dass laut dem Ergebnis der in einem Komitate Ungarns durchgeführten Tuberkulinproben jedermann bis zum 40. bzw. 50. Lebensjahr von Tuberkulose betroffen war. *Frank* [75] schreibt es den BCG-Impfungen zu, dass nur ein geringer Bruchteil der Meningitis- und der schweren Disseminationsfälle auf geimpfte Personen fällt. Die Erkrankten lebten ausnahmslos in infizierter Umgebung.

Den Kampf gegen den *Bauchtyphus* spiegeln mehrere Arbeiten wider. *Eörsi* [76] teilt statistische Angaben über die registrierten Typhusbazillenträger mit. Ein Aufsatz von *Rauss* [77] berichtet über Angaben über die mit präzipitiertem Typhusimpfstoff geimpften Personen; diese Angaben erbringen neue Beweise für die gute Immunisierungswirkung dieses Verfahrens. *Eörsi* [78] berichtet über eine Methode zur Phag-Typisierung der Typhusstämme und demonstriert an zahlreichen epidemiologischen Beispielen die praktische Bedeutung dieser Methode bei der Aufdeckung der Ursache der Typhusepidemien. In Verbindung mit der Widalschen Reaktion stellt *Ferenczy* [79] fest, dass die mit Fieber verbundenen Erkrankungen der geimpften Personen die Titerwerte häufig über die diagnostische Grenze hinaus erhöhen, so dass hierdurch Irrtümer möglich sind. *Biró* [80] beobachtete eine positive Widalsche Reaktion in Knochenmarkpunktaten bereits zu einem Zeitpunkt als die Agglutinine noch nicht im Blut erschienen waren. Auf den Weg der Verbreitung des Typhus weist der Umstand hin, dass *Ujváry* [81] aus der Schale von auf dem Markt gekauften Äpfeln Typhusbazillen zu züchten vermochte. *Mráz* und *Ujváry* [82] fanden unter 100 untersuchten Fällen keinen einzigen Typhusstamm, der sich einer Kombination von Penicillin, Streptomycin und Sulfathiazol gegenüber als resistent erwiesen hätte. Aus diesem Grunde erachten sie eine klinische Anwendung dieser Kombination für vielversprechend. *Fürész* [83] berichtet über die Erfolglosigkeit der Furazinbehandlung von chronischen Typhusbazillenträgern in Verbindung mit 9 Fällen.

Einen Fortschritt in der Diagnostik von *Salmonella* bedeutet der Umstand, dass es *Rauss* [84] gelang, bei Berücksichtigung der häufigsten in Ungarn vorkommenden Stämme ein vereinfachtes Schema auszuarbeiten, auf dessen Grundlage diese Stämme mit einer geringeren Anzahl von Seren identifiziert werden können als bisher. Die Ergebnisse der jahrzehntelangen Salmonellaforschung werden von *Rauss* [85] in einer anderen Arbeit zusammengefasst, welche neben der topographischen Verteilung der einzelnen Stämme auch die epidemiologische Bedeutung der einzelnen Typen auf Grund von ungarischen Beobachtungen erörtert. *Szabó* [86] berichtet über das Vorkommen des S. ballerup-Stammes

in Ungarn und [87] über einen neuen Kolitypus, der Salmonella-Antigene enthält.

Das Vordringen der *Dysenterieforschung* wird durch die grosse Zahl der Arbeiten über dieses Thema angezeigt. Mehrere Abhandlungen von *Rauss* [88, 89], die sich mit der Antigenstruktur der Flexner-Gruppe befassen, beschreiben das System der die Typen kennzeichnenden Typus- und Gruppenantigene, was zu einer Lösung der Klassifikationsfrage führte [90] und die Bestimmung der in Ungarn vorkommenden Flexner-Typen ermöglichte [91]. Diese Untersuchungen dürfen als das erste Ergebnis von systematischen Arbeiten zur Lösung der spezifischen Prävention angesehen werden. Zur Entwicklung der Dysenteriediagnostik trug *Serény* [92] durch die Ausarbeitung des D. C.-Nährbodens bei, der ein zumindest zweimal so gutes Züchtungsergebnis wie bei den bisher gebrauchten Nährböden gestattet. Dasselbe Resultat wird auch durch die weitere Beobachtung von *Serény* [93] ermöglicht, dass verdünnte Karbolsäure die Lebensdauer der Shigellen im Stuhl verlängert. Die Frage der Prävention wird von *Serény* [92, 94, 95] in mehreren Abhandlungen zusammengefasst, wobei er durch die Untersuchung der Antigenwirkung einer geringen Menge von Sh. dysenteriae in Menschen- und Tierversuchen einen neuen Beitrag zum Problem der spezifischen Prävention leistet [96]. In einer Mitteilung von *Rauss* [97] findet sich eine Zusammenfassung über die Möglichkeiten der Dysenterieschutzimpfung. *Ujváry* und *Mráz* [98] prüften die Empfindlichkeit der Shigellatypen gegenüber Antibiotika. Die Resistenz gegen Streptomycin ist häufig, besser waren die Ergebnisse mit einer Kombination von Streptomycin und Sulfathiazol, während sie in keinem einzigen Fall einen Chloromycetin und Aureomycin gegenüber refrektären Stamm antrafen.

Eines der bedeutendsten Ergebnisse der Arbeiten der letzten Jahre bildet die Klarstellung der *in Ungarn aufgetretenen Leptospirosen.* Nach früheren orientierenden Untersuchungen von *Alföldy* [99] züchteten *Alföldy* und *Füzy* [100] aus an Meningitis serose leidenden Kranken Leptospiren in Transdanubien. Auch die Infektionsquelle wurde in Feldmäusen festgestellt. Diese Untersuchungen erbrachten den Beweis, dass Leptospirose auch in Ungarn ziemlich häufig vorkommt.

Wegen ihres *mannigfaltigen Gegenstandes* sollen die in den meisten Fällen nur mit einer einzigen Arbeit vertretenen Untersuchungen trotz des Fehlens eines inneren Zusammenhanges in einer gemeinsamen Gruppe in Schlagzeilen erwähnt werden. *Riskó, Fazekas* und *Nikodémusz* [101, 102] beschrieben Fälle von Pseudomonas-Meningitis und Lungenabszess. *Serény* und *Kubinyi* [103, 104] arbeiteten ein vereinfachtes Verfahren der Weil-Felixschen Reaktion aus, das auf dem Objektträger ausgeführt werden kann. Eine Arbeit von *Rauss* und *Ujváry* [105] beschäftigte sich mit Angaben, welche die Koli-Ätiologie der bei Säuglingen auftretenden Gastroenteritisepidemien bekräftigen. *Darvas, Born*

und *Ujhelyi* [106] arbeiteten einen präzipitierten Impfstoff für die Immunisierung gegen Cholera aus. *Novák* und *Bárász* [107] berichten über die günstige Immunwirkung von präzipitiertem Tetanustoxoid. *Fornosi* und *Ujhelyi* [108] schildern die guten Ergebnisse von Tollwutimpfungen während mehrerer Jahre. *Surján* [109] identifizierte K. ozenae mit dem Perezschen Bazillus und nimmt seine ätiologische Rolle als erwiesen an. *Szőke* [110] stellte in Kaninchen ein antitoxisches Pertussis-Serum her. *De Châtel* und Mitarbeiter [111] beobachteten im Blut der an chronischer Polyarthritis leidenden Patienten Agglutinine gegenüber Streptokokken und sensibilisierte Erythrozyten. Nach *Backhausz* und Mitarbeitern [112] erscheinen im Blute von Rheumakranken und Tuberkulotikern Kälteagglutinine von hoher Avidität. *Márton* und Mitarbeiter [113] nahmen eine Hemmwirkung des Blutserums von Pemphiguskranken auf Staphylokokken wahr. *Benedek* studierte die Hautflora der von Leinerscher Erythrodermie befallenen Kranken und stellte dabei ein Dominieren von Staphylokokken fest. *Kesztyüs* und Mitarbeiter [114, 115] machten die Feststellung, dass das Myosin nicht zur Produktion von Isoimmunkörpern führt, während das Aktin isoantigene Eigenschaften aufweist. Sie gelangten weiters zum Ergebnis [116, 117], dass das Fibrinogen gleichfalls eine Organspezifizität zeigt. *Kovács* und *Vetro* [118] veröffentlichen bakteriologische und epidemiologische Angaben über Vergiftungen durch Speisen, die mit Staphylokokken infiziert waren. *Nógrády*, *Mráz* und *Ujváry* [119] erblicken den Grund für den günstigen Einfluss des Aureomycins bei Trachom in der auf die sekundäre Flora gerichteten Wirkung des Antibiotikums. Beachtung verdient auch die Versuchsreihe, die auf Veranlassung und unter Leitung von *Havas* [120] in Angriff genommen wurde. Diese Versuchsreihe stützt sich auf den Satz von Lyssenko über den Antagonismus der zu derselben Gattung gehörigen Arten und will die phylogenetischen Zusammenhänge zwischen den Mikrobengattungen und -arten sowie die Regeln der Entstehung und des Verschwindens der Arten klarlegen.

*

Hiermit bin ich am Ende meines Berichtes angelangt. Die kaleidoskopartige Mannigfaltigkeit weist auf die Vielschichtigkeit des Interesses der ungarischen Forscher hin, während die kurz umrissenen Ergebnisse zeigen, dass die Zielsetzungen im allgemeinen richtig waren, da sie nicht den Zusammenhang mit der Praxis und dem Leben verloren. Auf diese Weise dienen sie der Entwicklung unseres Wissens und der Verbesserung der Gesundheit unseres Volkes, bzw. werden ihnen dienen, sobald die fehlenden Kettenglieder gefunden sind. Mein Wunsch ist nun, dass die jetzt anhebenden Diskussionen der Sektion unser Wissen durch neue Ergebnisse bereichern und den Beginn einer Periode bedeuten mögen, die noch reichere Resultate zeitigt als die hiermit abgeschlossene.

LITERATUR

1. *Eörsi M.:* A szeszélesztő felhasználása a bakteriológiai táptalajok készítésében. (Die Verwendung von Bierhefe bei der Herstellung bakteriologischer Nährböden.) Népegészségügy 1172. (1947.)

2. *Vitéz I.:* Szójaliszt-húsporleves. (Sojamehl-Fleischpulversuppe.) Orvosi Hetilap 512. (1949.)

3. *Vitéz I.:* Baktériumtáptalaj vérplazmaporból és szójalisztből. (Bakteriennährboden aus Blutplasma-Pulver und Sojamehl.) Orvosok Lapja 466. (1946.)

4. *Serény B.* und *Grünwald J.:* Az agar-táptalajok készítésének racionalizálása. (Die Rationalisierung der Herstellung von Agarnährböden.) Népegészségügy 364 (1950.)

5. *Szára I.:* Casein hydrolyzátumok papirchromatográfiás vizsgálata. (Die papierchromatographische Untersuchung von Kaseinhydrolysaten.) Kísérletes Orvostudomány 55. (1951.)

6. *Takátsy Gy.:* Új módszer sorozatos hígítások gyors és pontos elvégzésére. (Eine neue Methode zur raschen und genauen Vornahme von Verdünnungsserien.) Kísérletes Orvostudomány 393. (1950.)

7. *Nógrády Gy.:* Új eszközök a bakteriológiai és serológiai laboratóriumban. (Neue Instrumente und Apparate im bakteriologischen und serologischen Laboratorium.) Kísérletes Orvostudomány 122. (1949.)

8. *Nódrády Gy.:* Újrendszerű automatapipetta. (Eine neuartige automatische Pipette.) Kísérletes Orvostudomány 391. (1950.)

9. *Szabó I.:* Kórokozók érzékenységének és resistenciájának meghatározása antibioticumokkal szemben. (Bestimmung der Sensibilität und Resistenz einiger Krankheitserreger gegen Antibiotika.) Orvosok Lapja 465. (1949.)

10. *Frank K.* und *Szabó I.:* Bakterium-resistentia vizsgálatok gyakorlati értékelése a csecsemő- és gyermekkorban. (Praktische Auswertung der Untersuchungen über die Bakterienresistenz im Säuglings- und Kindesalter.) Orvosi Heitlap 663. (1950.)

11. *Mráz T.* und *Ujváry Gy.:* Resistentia vizsgálatok az antibioticumok alkalmazásának szolgálatában. (Resistenzuntersuchungen im Dienste der Anwendung von Antibiotika.) Orvosi Hetilap 649. (1950.)

12. *Pálóczy J.:* Tapasztalatok a Bradhy- és Folger-féle gyors diphthéria tenyésztés módosításával. (Erfahrungen mit der modifizierten Bradhy- und Folgerschen Schnellzüchtungsmethode für Diphtherie.) Orvosok Lapja 257. (1947.)

13. *Nógrády Gy.:* A pneumobacillus tokanyagának fluoreszcens mikroszkópos vizsgálata. (Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Kapselmaterials des Pneumobazillus.) Népegészségügy 1576. (1946.)

14. *Szabó G.:* Quantitatív vizsgálatok a Gram festési fokozatokról. (Quantitative Untersuchungen der Gram-Färbungsgrades.) Acta Physiologica Academiae Scientiarum Hungaricae I. Suppl. 60. (1951.)

15. *Novák E.:* A Shiga-Kruse bacillus cukorerjesztésének gátlása antitoxinnal. (Hemmung der Zuckerfermentation des Shiga-Kruse-Bazillus mit Antitoxin.) Népegészségügy 820. (1946.)

16. *Ivánovics Gy.:* Some Observations on the Cultivation of Streptococcus haemolyticus in Chemically Defined Media. — Arkiv för Kemi, Mineralogi och Geologi 26, 8 (1948.)

17. *Simkovics G., Uri J.* und *Korossy S.:* Baktériumok szerzett resistentiájáról, különös tekintettel a dehydrogenasek activitására. (Über die erworbene Resistenz der Bakterien, mit besonderer Berücksichtigung der Aktivität der Dehydrogenasen.) Orvosi Hetilap 41. (1949.)

18. *Nikodémusz I., Jávor T., Fülöp T., Bányász T.* und *Ábel A.:* Fel tudják-e a baktériumok használni a növekedésükhöz az alkoholt szénhydrát forrásul? (Können Alkohole beim Wachstum der Bakterien als Kohlenquelle mitwirken?) Acta Physiologica Academiae Scientiarum Hungaricae I. Suppl. 56. (1951.)

19. *Nikodémusz I.* und *Nikodémusz K.:* Atypusos enzymaticus működésű tetanus bacillus. (Tetanusbazillus mit atypischer Enzymwirkung.) Orvosi Hetilap 1112. (1951.)

20. *Serény B.* und *Szita J.:* A bélbaktériumok ureáz-képzése. (Die Ureasebildung der Darmbakterien.) Népegészségügy 421. (1951.)

21. *Alföldy Z.:* A tőzeg fertőtlenítő hatása (Die Desinfektionswirkung des Torfes.) Népegészségügy 452. (1949.)

22. *Alföldy Z.* und *Szita J.:* Beszámoló egy új higanytartalmú fertőtlenítőszer, a »Merfen« desinficiens hatásáról. (Bericht über die Desinfektionswirkung eines neuen quecksilberhaltigen Desinfektionsmittels, des »Merfen«.) Orvosi Hetilap 1313. (1951.)

23. *Vitéz I.* und *Ács L.:* Chlortartalmú vegyületek jelentősége gümős anyagok fertőtlenítésében. (Bedeutung der chlorhaltigen Verbindungen in der Desinfektion von tuberkulösen Materialen.) Népegészségügy 321. (1948.)

24. *Tarnóczy T.* und *Joó I.*: Ultrahangok hatása a typhus bacillus antigénjeire. (Wirkung von Ultraschall auf die Antigene des Typhusbazillus.) Kísérletes Orvostudomány 132. (1951.)

25. *Joó I.* und *Tarnóczy J.*: Ultrahangok hatása a typhus bacillus antigenjeire. — Immunizálási és flokkulációs kísérletek. (Wirkung der Ultraschallwellen auf die Antigene des Typhusbazillus. — Immunisierungs- und Flockungsversuche.) Kísérletes Orvostudomány 184. (1951.)

26. *Gál I.*, *Jávor T.*, *Kesztyüs L.*, *Lázár J.*, *Nikodémusz I.*, *Szilágyi I.* und *Végh L.*: A Röntgen-sugár hatása a diphtheria toxinra. (Wirkung des Röntgenstrahles auf das Diphtherietoxin.) Kísérletes Orvostudomány 363. (1951.)

27. *Kemény L.* und *Illés É.*: A perfringens szérumok értékmérése lecitho-vitellin próbával. (Titrierung von B. perfringens-Seren mit der Lezitho-Vitellinprobe.) Kísérletes Orvostudomány 321. (1951.)

28. *Szathmáry J.*: A serumok tisztításáról és concentrálásáról. (Reinigung und Konzentrierung von Seren.) Népegészségügy. — Im Druck.

29. *Mansfeld G.*: Az infectió és immunitás élettana. (Die Physiologie der Infektion und Immunität.) Orvosok Lapja 321. (1948.)

30. *Láng S.*: Kéreghormon hatása az agglutinin- és haemolysin-termelésre. (Wirkung des Rindenhormons auf die Agglutinin- und Hämolysinerzeugung.) Orvosi Hetilap 495. (1950.)

31. *Mandula F.*: Új serológiai módszer lues szűrővizsgálatára. (Eine neue serologische Methode zur Massenuntersuchung von Lues.) »A dermato-venerologia haladása a szakmai továbbképző tanfolyamok tükrében« c. könyv. 133. S. (M. O. K. T. 1949.)

32. *Somos E.*: Berger-Kahn reactio. Praecipitatios próba syphilisnél. Módosítás szűrővizsgálatra, valamint vidéki orvosok részére. (Die Berger-Kahnsche Reaktion. Präzipitationsprobe bei Syphilis. Eine Modifizierung für Massenuntersuchungen sowie für die Provinzärzte.) Orvosok Lapja 149. (1948.)

33. *Somos E.*: A Wassermann-reactio mikroreactióvá való átalakítása. (Die Umgestaltung der Wassermannreaktion zu einer Mikroreaktion.) Orvosok Lapja 885 (1948.)

34. *Somos E.* und *Rácz I.*: A Meinicke KR. mikroreakcióvá való átalakítása. (Die Umgestaltung der Meinicke KR. zu einer Mikroreaktion.) Bőrgyógyászat és Venerológiai Szemle 139. (1948.)

35. *Somos E.*, *Káldor I.* und *Rácz I.*: Vizsgálatok pozitív seroreakciók specificitásának eldöntésére. (Untersuchungen zur Entscheidung der Spezifizität von positiven Seroreaktionen.) Orvosi Hetilap 899. (1951.)

36. *Rex—Kiss B.* und *Kiss J.*: Az aspecifikus pozitív lueses seroreakciókról és az alkohol befolyásáról a lueses seroreakciókra (Über aspezifische positive Lues-Seroreaktionen und über den Einfluss des Alkohols auf die Lues-Seroreaktionen.) Népegészségügy 4. (1948.)

37. *Berger G.* und *Steinert Gy.*: A szifiliszreakciók antigénjeinek hatóanyagáról. (Über den Wirkstoff der Antigene der Syphilisreaktionen.) Orvosi Hetilap 21. (1949.)

38. *Plank E.*: A complement-titer reticuloendothel rendszertől függő változása. (Die vom retikuloendothelialen System abhängige Veränderung des Komplementtiters. (Bőrgyógyászati és Venerológiai Szemle 68. (1948.)

39. *Garay K.* und *Rácz I.*: Adatok a szérumfehérjék szerepéhez a Wassermann-reakcióban. (Ultrahang hullámok hatása a Wassermann-reaginra.) (Beiträge zur Rolle der Serumeiweisskörper in der Wassermann-Reaktion. Die Wirkung von Ultraschallwellen auf das Wassermannreagin.) Orvosi Hetilap 264. (1948.)

40. *Káldor I.*, *Somos E.* und *Rácz I.*: A Wassermann-reagin megoszlása a vérsavó fehérjefractioi között. (Vizsgálatok quantitatív szempontból.) (Die Verteilung des Wassermannreagins unter den Eiweissfraktionen des Blutserums. Untersuchungen vom quantitativen Gesichtspunkt.) Orvosi Hetilap 525. (1948.)

41. *Káldor I.* und *Somos E.*: Quantitativ Wassermann-reakciók seroresistentiánál. (Quantitative Wassermannreaktion bei Seroresistenz.) Orvosi Hetilap 133. (1948.)

42. *Káldor I.* und *Somos E.*: Quantitatív serologiai vizsgálatok a syphilis különböző szakaiban. (Quantitative serologische Untersuchungen in den verschiedenen Stadien der Syphilis.) Orvosi Hetilap 1245. (1950.)

43. *Somos E.* und *Káldor I.*: A Wassermann reactio érzékenységének növelése. (Felfelé titrálás.) (Die Steigerung der Empfindlichkeit der Wassermannreaktion. Titrierung nach oben.) Orvosi Hetilap 533. (1948.)

44. *Somos E.* und *Rácz I.*: Az önkötésről. (Vizsgálatok emberi vérsavóval quantitatív szempontból.) (Über die Eigenhemmung. Quantitative Untersuchungen mit menschlichem Blutserum.) Orvosi Hetilap 264. (1950.)

45. *Went I.* und *Kesztyüs L.*: Tierexperimentelle Untersuchungen mit Histaminazoprotein. Acta Medica Hung. II. 1 (1951). 89.

46. *Adler*, *Went I.* und *Kesztyüs L.*: Immunization Experiments with Procaine-Azoprotein. Oral Surgery 9 (1949.)

47. *Went I.* und *Kesztyüs L.*: Novocainazofehérje előállítása és immunológiai tulajdonságai. (Herstellung und immunologische Eigenschaften von Novocain-Azoprotein. (Kísérletes Orvostudomány 58. (1949.)

48. *Haynal I.*: A dizentéria, a pneumococcus és a meningococcus-meningitis gyógyítása anafilaxia létrehozatalával. (Die Heilung der Dysenterie, der Pneumokokken- und der Meningokokken-Meningitis durch Hervorrufen von Anaphylaxie.) Magyar Tudományos Akadémia Orvostudományi Osztályának közleménye II. 1 (1951). 161.

49. *Kemény T., Filipp G., Csalay L.* und *Kelenhegyi M.*: Gonádok, thymus és anaphylaxia. (Gonaden, Thymus und Anaphylaxie.) Kísérletes Orvostudomány 2 (1951). 145.

50. *Rauss K.* und *Szilárd Z.*: Kísérleti adatok az idült cholecystitis pathogeneziséhez. (Versuchsangaben zur Pathogenese der chronischen Cholezystitis.) Orvosi Hetilap 382. (1948.)

51. *Backhausz R.* und *Neubauer Gy.*: Rh-ellenanyagtermelés emberen és patkányon. (Produktion von Rh-Immunstoffen am Menschen und an Ratten.) Orvosi Hetilap 475. (1949.)

52. *Backhausz R., Nemeskéri J.* und *Vajda Gy.*: Rh-Faktor Untersuchungen in Ungarn. Homo I. 3 (1950.)

53. *Iványi Gy., Backhausz R.* und *Neubauer Gy.*: Adatok a magicterus kórképéhez. (Angaben zum Krankheitsbild des Kernicterus.) Gyermekgyógyászat 2 (1951.)

54. *Backhausz R.* und *Vajda Gy.*: Anti-Rh savók citotropikus hatása. (Zytotropische Wirkung von Anti-Rh-Seren.) Kísérletes Orvostudomány 81. (1951.)

55. *Kubányi E.*: A vércsoportmeghatározás hideg-agglutininek okozta tévedésről, háborús tapasztalat alapján. (Über die durch Kälteagglutinine verursachten Irrtümer bei der Blutgruppenbestimmung, auf Grund von Kriegserfahrungen.) Orvosok Lapja 197. (1945.)

56. *Rex-Kiss B.* und *Kiss I.*: Immunizálási kísérletek emberen csoportidegen antigénekkel. (Immunisierungsversuche an Menschen mit gruppenfremden Antigenen.) I. Mitteil. Orvosok Lapja 405 (1947.)

57. *Ujhelyi K.* und *Darvas J.*: Vizsgálatok a magyarországi vörhenyjárvánnyal kapcsolatban. (Untersuchungen im Zusammenhang mit der Scharlachepidemie in Ungarn.) Népegészségügy 563. (1950.)

58. *Mihályfi I.*: A vörheny kórokozója és az ellene való küzdelem. (Der Krankheitserreger des Scharlachs und seine Bekämpfung.) Népegészségügy 260. (1951.)

59. *Ormay L.*: Szovjet adatok a vörhenyproblémához. (Sowjetische Angaben zum Scharlachproblem.) Népegészségügy 244. (1951).

60. *Szabó I.*: Adatok az endocarditis kórokozóinak kitenyészthetőségéhez. (Angaben zur Züchtbarkeit des Erregers der Endocarditis.) Orvosi Hetilap 407. (1949.)

61. *Szmuk I.* und *Parády Z.*: Új serológiai reactio különösen tekintettel az endocarditis lenta korai felismerésére és az alkalmazott antibioticumok hatásának ellenőrzésére. (Eine neue serologische Reaktion mit besonderer Berücksichtigung des frühen Erkennens der Endocarditis lenta und der Kontrolle der Wirkung der angewandten Antibiotika.) Orvosi Hetilap 844. (1950.)

62. *Alföldy Z.* und *Kenedy D.*: A gonococcus tenyésztéséről. (Über die Züchtung von Gonokokken.) Népegészségügy 65. (1948.)

63. *Kenedy D.* und *Alföldy Z.*: Examination of the Penicillin Sensibility of Gonococcus Strains in Gonorrhoea Resistant to Penicillin Treatment. Acta Urologica 209. (1947.)

64. *Patkós Gy.*: A gonococcus fertőzőképességének bakteriológiai bírálata. (Die bakteriologische Beurteilung der Infektivität von Gonokokken.) Népegészségügy 409. (1949.)

65. *Jobst P.*: A gonococcus vitális festése. (Die vitale Färbung der Gonokokken.) Orvosok Lapja 1319. (1946.)

66. *Ivánovics Gy.*: A gümőbacillus tenyésztésének új szempontjai. (Neue Gesichtspunkte bei der Züchtung des Tuberkelbazillus.) Orvosi Hetilap 366. (1949.)

67. *Szabó I.*: A tuberkulózis bakteriológiai diagnosztikájáról. (Über die bakteriologische Diagnostik der Tuberkulose.) Pneumonologia Danubiana 1—3 32. (1949.)

68. *Szabó I.*: Adatok a Mycobakterium tbc. diagnosztikájához a Diagnosztikai Laboratórium 1949. évi munkájának tükrében. (Angaben über die Diagnostik des Tbc-Mycobakteriums im Spiegel der Arbeit des diagnostischen Laboratoriums im Jahre 1949.) Tuberculosis Kérdései Nr. 3. S. 11. (1951.)

69. *Szabó I.*: Újabb szempontok a tuberkulózis korai diagnózisánál. (Ein neuer Gesichtspunkt bei der frühzeitigen Diagnose der Tuberkulose.) Orvosi Hetilap 502. (1951.)

70. *Kováts T.* und *Földes I.*: A gümőbacillus kimutatása különös tekintettel a mikrokultúrákra. (Der Nachweis des Tuberkelbazillus mit besonderer Berücksichtigung der Mikrokulturen.) Kísérletes Orvostudomány 231. (1950.)

71. *Sipos C. H.*: Nouvelles expériences avec le filtrat d'une suspension acqueuse du bacille de Koch. Acta Medica Hung. 325. (1950.)

72. *Havas A.*: A dán-magyar BCG-akció részleges eredményei. (Teilweise Ergebnisse der dänisch-ungarischen BCG-Aktion.) Népegészségügy 1831. (1947.)

73. *Havas A.:* A BCG-oltások. (Die BCG-Impfungen.) Népegészségügy 129. (1948.)
74. *Havas A.:* A BCG mai állása. (Der heutige Stand des BCG.) Népegészségügy 689. (1948.)
75. *Frank:* Súlyos tbc.-s formák előfordulásának gyakorisága BCG-zett és nem védett gyermekeknél. (Häufigkeit des Vorkommens schwerer Tbc-Fälle bei Kindern, die mit BCG geimpft bzw. nicht geimpft wurden.) Népegészségügy.
76. *Eörsi M.:* A typhus abdominalis elleni küzdelem és a chronikus typhus bacillusgazdák. (Bekämpfung des Abdominaltyphus und die chronischen Typhusbazillenträger.) Népegészségügy 1844. (1947.)
77. *Rauss K.:* A hastyphus praeventiója védőoltásokkal. (Prävention von Bauchtyphus durch Schutzimpfungen.) Népegészségügy 2193. (1947.)
78. *Eörsi M.:* Új laboratóriumi eljárás a hastyphus leküzdésének szolgálatában. (Eine neue Laboratoriumsmethode im Dienste der Bekämpfung des Abdominaltyphus.) Népegészségügy 460. (1950.)
79. *Ferenczi S.:* A Widal-reactio viselkedéséről typhus elleni védőoltásoknál különböző lázas betegségek hatására. (Über das Verhalten der Widalschen Reaktion bei Schutzimpfungen gegen Typhus infolge der Wirkung verschiedener Fieberkrankheiten.) Orvosi Hetilap 212. (1951.)
80. *Biró L.:* Csontvelővel végzett aggl. vizsgálatok. (Mit Knochenmark durchgeführte Agglutinationsuntersuchungen.) Népegészségügy 1099. (1946.)
81. *Ujváry Gy.:* A gyümölcs szerepe a hastyphus terjesztésében. (Die Rolle des Obstes bei der Verbreitung des Bauchtyphus.) Népegészségügy 517. (1950.)
82. *Mráz T.* und *Ujváry Gy.:* S. typhi rezisztenciája antibiotikumokkal és kemoterapeutikumokkal szemben. (Die Resistenz von S. typhi gegenüber Antibiotika und Chemotherapeutika.) Népegészségügy 519. (1950.)
83. *Fürész I.:* Hastyphus betegek és bacillusgazdák chloromycetin kezelése. (Behandlung von Bauchtyphuskranken und -bazillenträgern mit Chloromycetin.) Orvosi Hetilap 1098. (1951.)
84. *Rauss K.:* Salmonella-törzsek egyszerűsített serológiai diagnózisa. (Eine vereinfachte serologische Diagnose für Salmonella-Stämme.) Népegészségügy 359. (1950.)
85. *Rauss K.:* A magyarországi paratífusz fertőzések jelentősége. (Bedeutung der Paratyphusinfektionen in Ungarn.) Népegészségügy 6. (1949).
86. *Szabó I.:* Egy ritka Salmonella-typus előfordulása. (Das Vorkommen eines seltenen Salmonella-Typs.) Népegészségügy 226. (1949.)
87. *Szabó I.:* A Salmonella Coli I. csoport új tagja. (Ein neues Mitglied der I. Gruppe von Salmonella coli.) Népegészségügy 129. (1951.)
88. *Rauss K.:* Újabb adatok a Flexner-bacillus rendszertanához. (Neue Beiträge zur Systematik des Flexnerschen-Bazillus.) Népegészségügy 242. (1946.)
89. *Magyar K.* und *Kétyi I.:* Összehasonlító antigénszerkezeti vizsgálatok a Sh. Flexneri csoportban. (Vergleich der Antigenstrukturen in der Gruppe von Sh. flexneri.) Kísérletes Orvostudomány 378. (1950.)
90. *Rauss K.:* Classification of Sh. Flexneri. Acta Physiol. Hung. 165. (1950.)
91. *Magyar K.* und *Kétyi I.:* Shigella flexneri typusok Magyarországon. (Shigella flexneri-Typen in Ungarn.) Népegészségügy 568. (1950.)
92. *Serény B.:* A dizentériaellenes közegészségügyi munka legközelebbi feladatai. (Die nächsten Aufgaben des Volksgesundheitswesens im Kampfe gegen die Dysenterie.) Népegészségügy 266. (1951.)
93. *Serény B.:* A dizentériabacillus rezisztenciája. (Die Resistenz der Dysenteriebazillen.) Népegészségügy 457. (1951.)
94. *Serény B.:* A vérhas megelőzésének feladatai. (Aufgabe der Dysenterieprävention.) Népegészségügy 417. (1948.)
95. *Serény B.:* A bélfertőzésekről. (Über Darminfektionen.) Népegészségügy 394. (1949.)
96. *Serény B.*, *Laping M.* und *Dallos A.:* Kis mennyiségű Sh. dysenteriae antigénhatása (Antigenwirkung kleiner Mengen von Sh. dysenteriae.) Népegészségügy 179. (1951.)
97. *Rauss K.:* A dysenteria védőoltás kérdése. (Die Frage der Schutzimpfung gegen Dysenterie.) Népegészségügy 449. (1948.)
98. *Ujváry Gy.* und *Mráz T.:* A Sh. dysenteriae antibiotikumokkal szembeni érzékenységéről. (Über die Empfindlichkeit von Sh. dysenteriae gegenüber Antibiotika.) Népegészségügy 425. (1951.)
99. *Alföldy Z.:* A leptospirosis mai állása. (Der heutige Stand der Leptospirose.) Népegészségügy 1836. (1947.)
100. *Alföldy Z.* und *Füzy M.:* Leptospirás meningitisek előfordulása Zala megyében. (Das Vorkommen von Meningitis leptospirosa im Komitate Zala.) Népegészségügy 104. (1950.)
101. *Riskó T.* und *Nikodémusz I.:* Pseudomonas fluorescens mint kórokozó. (Pseudomonas fluorescens als Krankheitserreger.) Népegészségügy 106. (1950.)

102. *Fazekas Á.* und *Nikodémusz I.:* Über einen Fall von Pyocyaneus-Meningitis. Wiener Klin. Wochenschrift **48**. 903. (1950.)

103. *Serény B.:* Kiütéses tífusz tájékoztató vérpróbája. (Orientierende Blutprobe bei Flecktyphus.) Népegészségügy 104. (1948.)

104. *Serény B.* und *Kubinyi J.-né:* Próbaagglutinációs eljárás a kiütéses tífusz diagnosztikájában. (Das Probeagglutinationsverfahren in der Diagnostik von Flecktyphus.) Népegészségügy 725. (1948.)

105. *Rauss K.* und *Ujváry Gy.:* Adatok a csecsemőkori fertőző gastroenteritis kóroktanához. (Angaben zur Ätiologie der infektiösen Gastroenteritis im Säuglingsalter.) Népegészségügy 415. (1951.)

106. *Darvas J., Born J.* und *Ujhelyi K.:* Az ázsiai kolera elleni aktív immunizálás új anyaga és a betegség kórtanának egyes kérdései. (Ein neues Material zur aktiven Immunisierung gegen die asiatische Cholera und einzelne Fragen der Pathologie dieser Krankheit.) Népegészségügy 158. (1950.)

107. *Novák E.* und *Bárász T.:* Tanulmány a tetanus toxoid praecipitatum immunhatásáról. (Studie über die Immunwirkung des Tetanustoxoidpräzipitats.) Kísérletes Orvostudomány. Sondernummer (1949.)

108. *Fornosi F.* und *Ujhelyi K.:* A lyssa elleni emberi védőoltások eredménye 1945—1949-ben. (Das Ergebnis der Schutzimpfungen der Menschen gegen Tollwut in den Jahren 1945—1949.) Népegészségügy 29. (1951.)

109. *Surján L.:* Adatok az ozaena aetiologiájához. (Angaben zur Ätiologie von Ozaene.) Kísérletes Orvostudomány 418. (1950.)

110. *Szőke A.:* A pertussis-immunitásra vonatkozó vizsgálatok. (Untersuchungen über die Immunität gegenüber Pertussis.) Orvosi Hetilap 378. (1948.)

111. *de Châtel A., Csiky T.* und *Fischer A.:* Chronikus polyarthritises betegek vérének streptococcus-agglutinatiója. (Streptokokkenagglutination im Blute von chronischen Polyarthritiskranken.) Orvosi Hetilap 686. (1949.)

112. *Backhausz R., Balás B.* und *Vajda Gy.:* Adatok a hidegagglutininek előfordulásához rheumás és tuberkulotikus betegekben. (Angaben zum Vorkommen von Kälteagglutininen in Rheuma- und Tuberkelkranken.) Orvosi Hetilap 1344. (1950.)

113. *Márton K.* und *Bolányi I.:* Pemphigus-betegek vérsavóinak bakteriostatikus hatásáról. (Über die bakteriostatische Wirkung des Blutserums von Pemphiguskranken.) Bőrgyógyászati és Venerológiai Szemle 73. (1950.)

114. *Kesztyüs L., Nikodémusz I.* und *Szilágyi T.:* Antigenic Activity of Myosin and Actin. Nature 136 (1949.)

115. *Kesztyüs L., Nikodémusz I.* und *Szilágyi T.:* Über die Artspezifizität des Aktins. Experientia 342. (1950.)

116. *Kesztyüs L., Szilágyi T., Nikodémusz I.* und *Jávor T.:* Antigenic Behaviour of Fibrinogen. Acta Physiol. Hung. 1 (1950).

117. *Kesztyüs L., Szilágyi T., Nikodémusz I.* und *Jávor T.:* A fibrinogen antigén tulajdonságai. (Antigeneigenschaften des Fibrinogens.) Kísérletes Orvostudomány 252. (1950.)

118. *Kováts T.* und *Vetró J.:* Staphylococcustoxin okozta csoportos élelmiszermérgezés. (Durch Staphylokokkentoxin hervorgerufene gruppenweise Speisenvergiftung.) Népegészségügy 485. (1951.)

119. *Nógrády Gy., Mráz T.* und *Ujváry Gy.:* Az aureomycin antibiotikus hatása különféle baktériumokra, valamint a normál és trachomás kötőhártya baktériumflórájára. (Die antibiotische Wirkung des Aureomycins auf verschiedene Bakterien, sowie auf die Bakterienflora der normalen und der von Trachom befallenen Bindehaut.) Szemészet 16. (1951.)

120. *Havas A.* und *Kubinyi J.-né:* Egy nemhez (genus) tartozó, közelálló fajok (species) egyedeinek egymásközötti viselkedése a mikrobiológiában. (Das Verhalten der Individuen von zu derselben Gattung gehörenden, einander nahestehenden Arten in der Mikrobiologie.) Népegészségügy 155. (1951.)

ÜBERSICHT ÜBER DIE VETERINÄRMEDIZINISCHE LITERATUR AUF DEM GEBIETE DER BAKTERIOLOGIE UND DER IMMUNITÄTSLEHRE 1945—1951

R. MANNINGER

Institut für Seuchenlehre der Veterinärhochschule in Budapest

Die ungarischen Veterinärmikrobiologen gingen, nachdem sie ihre durch die Kriegsereignisse zerstörten Laboratorien halbwegs in Ordnung gebracht hatten, anfänglich freilich nur mit behelfsmässig hergestellter Einrichtung, allsogleich an die Forschungsarbeit, die dann später dank der reichlichen Mitteln, die ihnen von der Volksdemokratischen Republik in grosszügiger Weise zur Verfügung gestellt wurde, stetig mehr erweitert und vertieft werden konnte. Ihr Bestreben ging anfänglich vollauf und auch später zum grössten Teil dahin, Probleme zu lösen, die auf das Engste mit den Anforderungen des praktischen Lebens verknüpft waren. Es handelte sich nämlich darum, durch ihre Arbeit das Verständnis der praktisch wichtigsten Infektionskrankheiten der Haustiere zu fördern und Methoden auszuarbeiten oder zu verbessern, die zur Bekämpfung dieser Krankheiten herangezogen werden können. In dieser Übersicht werden Probleme parasitologischer Natur nicht berührt (mit ihnen wird sich mein Kollege Prof. Kotlán eingehend beschäftigen); es sollen, wegen der Kürze der mir zur Verfügung stehenden Zeit freilich nur in grossen Zügen, bloss jene Arbeiten besprochen werden, die sich auf die Klärung der mikrobiologischen und immunologischen Verhältnisse bei den durch Virusarten und Bakterien erregten Infektionskrankheiten richteten.

Von den *virusbedingten Krankheiten* stand fraglos die *Geflügelpest* im Vordergrunde des Interesses. Die Krankheit trat als Seuche im Jahre 1941 auf und verursachte seither schwerwiegende Verluste. Bis 1945 sind wohl die Eigenschaften des Seuchenerregers im grossen und ganzen klargestellt worden, doch wurden zu seiner besseren Kenntnis auch seither in mehreren Richtungen Versuche angestellt. Von diesen seien zunächst die Untersuchungen von Bamberger [2] und von Gelenczei [46] über die hämagglutinierenden Eigenschaften des Virus und die Arbeit von Medgyesi [25] erwähnt, wonach zwischen der Konzentration des Virus und seiner hämagglutinierenden Wirkung ein gerades Verhältnis besteht. Sinkovits [103], der mit einem aus einer menschlichen Erkrankung isolierten Virusstamm arbeitete, hat ferner nachgewiesen, dass das Virus auch an die Lungen der Maus angepasst werden kann. Dass das Virus, durch welches die gegenwärtige Seuche verursacht wird, der sog. Newcastle-Variante angehört.

war auch schon vorher bekannt. Manninger [72, 73] gelang es jedoch, teils an der Hand von Literaturstudien, im Gegensatz zur fast allgemein vertretenen Ansicht, nachzuweisen, dass auch schon früher, selbst in den dreissiger Jahren des XIX. Jahrhunderts, zumindest in Ungarn, Seuchen von diesem Typus geherrscht haben, und machte darauf aufmerksam, dass im Laufe der Seuche der immunbiologische Charakter des Virus eine Änderung erfahren kann, eine Möglichkeit, deren Eintritt die Modifizierung der spezifischen Bekämpfungsverfahren notwendig machen möchte. Mit Rücksicht auf diese Möglichkeit kontrollierte Gelenczei seither ständig den immunbiologischen Charakter des Virus, ohne jedoch bisher des Auftauchen einer neuen Variante nachgewiesen zu haben.

Nach 1945 bestand die wichtigste Aufgabe darin, die Bekämpfung der Geflügelpest durch spezifische Eingriffe zu ermöglichen, da durch veterinärpolizeiliche Massnahmen allein die Eindämmung der Seuche nicht gelungen war.

Schneider [97, 98] gelang es alsbald nachzuweisen, dass sich durch Hyperimmunisierung von Truthühnern ein wirksames Immunserum herstellen lässt, und dass es in Ermangelung einer hinreichenden Menge von Immunseren möglich ist, zur passiven Immunisierung von der Ansteckung ausgesetzten Tieren ein Präparat zu verwenden, das aus dem Antikörper enthaltenden Dotter von Eiern durchgeseuchter Hühner hergestellt werden kann. Nachdem darauf Buzna und Horváth [20] nachgewiesen hatten, dass auch durch Hyperimmunisierung von Hühnern, und zwar viel billiger als von Truthühnern, ein entsprechendes Immunserum hergestellt werden kann, gelang es den Serumbedarf des ganzen Landes zu sichern. Die Herstellung einer hinreichenden Menge von Immunserum ermöglichte die Einführung der Simultanmethode zur Impfung der verseuchten Geflügelbestände. Aus den interessanten Versuchen von Hegyeli [51, 53] und von Bamberger [4] ging zwar hervor, dass Immunseren auch von Säugetieren gewonnen werden können, derartige Seren eigneten sich jedoch für die Praxis aus dem Grunde nicht, weil sie bei den hühnerartigen Vögeln, die in der zoologischen Verwandtschaftsreihe von den serumspendenden Säugetieren weitab stehen, bloss eine allzu rasch abklingende passive Immunität zu erzeugen vermögen.

Da das Hauptgewicht natürlich auf die präventive Schutzimpfung der noch nicht verseuchten Bestände gelegt werden musste, richtete sich das Bestreben der Forscher in erster Linie auf die Ausarbeitung entsprechender Vakzinepräparate. Es wurden wohl schon vor 1945 vereinzelte Schutzimpfungsversuche mit einer nach dem Verfahren von Traub hergestellten inaktivierten Vakzine unternommen, in der Praxis hat sich aber in weiterem Ausmasse bis zur Einführung der H-Vakzine nur die Vakzine von Schneider [97, 99] durchzusetzen vermocht, die im Grunde genommen auf demselben Prinzip beruht wie die von Traub, mit dem Unterschiede jedoch, dass das in Kückenembryonen zur Vermehrung gebrachte Virus nach seiner Inaktivierung durch Formalin nicht an ein Aluminiumhydroxydgel, sondern an aktive Kohle adsorbiert wird. Die Einführung dieser Vakzine in die Praxis bedeutete zwar einen

gewaltigen Schritt vorwärts in der Bekämpfung der Geflügelpest, doch konnte dieser Impfstoff zur Durchimpfung des Geflügelbestandes von ganz Ungarn, teils wegen der Umständlichkeit seiner Herstellung, teils wegen der verhältnismässig kurzen Dauer der Impfschutzes nicht verwendet werden (Murányi, Romváry und Temesi [90], Csontos und Hodossy [28], Csörsz [33], Bamberger [3] u. a.). Es bestand daher die Aufgabe darin, nach Virusstämmen von verminderter Virulenz zu fahnden, von deren Verwendung zur Impfung der empfänglichen Bestände womöglich im ganzen Lande die Entwicklung einer langdauernden aktiven Immunität zu erhoffen war. Auf das Vorkommen von Virusstämmen von verminderter Virulenz auch bei manchen hiesigen Seuchenausbrüchen machte Csörsz [29—33] aufmerksam, der sich auch durch die Feststellung der Bedingungen der Entwicklungsdauer und des Verschwindens der aktiven Immunität bei der Geflügelpest hervorragende Verdienste erworben hat. Andererseits versuchten Hegyeli [50, 54] sowie Elek und Prokopowitsch [41] die Virulenz des Geflügelpestvirus durch Taubenpassagen abzuschwächen, vorläufig allerdings ohne Erfolg. Letzten Endes stellte es sich aber bald heraus, dass sich dem Ziel am besten jener Virusstamm (kurzweg als H-Stamm bezeichnet) eignet, den Dodson im Jahre 1934 in Hertfordshire isoliert hatte (Hodossy [57], Bamberger [3, 5]). Nach reichlichen Laboratoriumversuchen wurde der ganze Hühnerbestand Ungarns mit einer Vakzine durchgeimpft, der diesen H-Stamm in lebendem Zustand enthält, in bereits verseuchten Beständen teilweise allerdings auch durch gleichzeitige Anwendung von Immunserum (Simultanmethode). Dadurch gelang es die sehr verlustreiche Seuche sozusagen mit einem Schlage zum Stillstand zu bringen (Benedek und Tóth [13]). Es stellte sich dabei allerdings heraus, dass die Simultanmethode bei weitem keine so langdauernde Immunität gewährleistet als die Impfung mit Vakzine allein, und deshalb wird nach dem Vorschlag von Bamberger in Beständen, wo eine längere Immunitätsdauer erwünscht ist, noch eine Nachimpfung mit der Vakzine allein durchgeführt. Interessant ist hierbei die von Buzna und Hodossy [18, 19] sowohl in der Praxis wie im Laboratorium gemachte Erfahrung, wonach Tiere, die kurz vor oder nach der Vakzineimpfung der Ansteckung ausgesetzt sind, nicht oder nur in sehr milder Form erkranken, dabei aber eine aktive Immunität erwerben. Sie erklären diese Erfahrung durch die Annahme eines Interferenzphänomens (eines Blockierungseffektes). Nach der Vakzineimpfung macht sich übrigens die aktive Immunität bereits nach 48 Stunden bemerkbar (Buzna und Hodossy [18, 19]), nach 6 Tagen ist sie vollentwickelt (Csörsz [32]) und dauert bei Hühnern, die im Alter über 6 Wochen geimpft worden sind, mindestens ein Jahr lang (Horváth [60]). Sollte dann und wann nach einem Jahre die Immunität bereits eine Verminderung erfahren haben, so ist sie soweit doch noch aktiv, dass die meisten Tiere die Krankheit in milder Form durchmachen. Es sind Versuche auch zur Klärung der Frage unternommen worden, ob nicht aus dem Grade der hämagglutinationshemmenden Fähigkeit des Serums der Impflinge auf das

Bestehen der aktiven Immunität geschlossen werden könne. Es zeigte sich, dass in Fällen, wo durch das Serum eines Impflings die Hämagglutination gehemmt wird, eine aktive Immunität mit Sicherheit angenommen werden kann, das Fehlen dieser Eigenschaft jedoch nicht das Gegenteil beweist (Gelenczei [46]). Antikörper, durch die die Hämagglutination gehemmt wird, finden sich 60 Tage nach der Impfung noch im Serum eines jeden Tieres, und auch noch nach 3—4 Monaten lassen sich solche, wenngleich in verhältnismässig geringer Menge, bei vielen Tieren nachweisen (Bamberger [5]).

Mehrere Arbeiten befassen sich mit der Technik der Herstellung der H-Vakzine (Buzna [16], Schneider [101], Szakmáry [95], Bodon und Csontos [15]). An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass sich von den angeführten Verfassern Szakmáry [95, 96] vielseits mit technischen Problemen, z. B. mit der Lyophilisierung und mit Ultrazentrifugen, beschäftigt hat, deren Lösung auch für die Mikrobiologie nutzbringend ist.

Die in der Zucht und Haltung der Schweine seit Ende des Krieges eingetretenen Wandlungen hatten zur Folge, dass die vorher zur Bekämpfung der *Schweinepest* mit vorzüglichem Erfolg angewandte Simultanimpfung in vielen Beständen mehr oder weniger versagt hat. Durch die Misserfolge wurden mehrere Verfasser (Benedek, Bugyáki, Kollonay, Szent Iványi und Darvas [11], Csontos [22], Szent Iványi [104], Fehér [42, 44] u. a.) bewogen, sich mit der Ätiologie dieser Krankheit sowie mit den immunbiologischen Verhältnissen bei den kranken Tieren zu beschäftigen. Die kritische Behandlung dieser Probleme führte dann unter Berücksichtigung der Ergebnisse grossangelegter Versuche zu dem Ergebnis, dass die Schweinepest in Ungarn durch ein einheitliches Virus bedingt ist und dass man so mit einer Pluralität des Schweinepestvirus nicht zu rechnen hat (Csontos, Hirt, Köves, Manninger [26]); andererseits erleichterte die Klärung der immunbiologischen Verhältnisse das Verständnis der Schwierigkeiten, die sich bei der Simultanimpfung bemerkbar machen und ermöglichte die klare Festsetzung der Bedingungen, die bei der Bekämpfung der Seuche durch Impfungen berücksichtigt werden müssen (Manninger [69, 74, 83]).

Zur Verbesserung der präventiven Schutzimpfung gegen die Schweinepest machte sich auch der Wunsch geltend, statt der Simultanimpfung allmählich ein Impfverfahren einzuführen, bei der mit einer Vakzine gearbeitet werden kann, die lebendes Virus nicht enthält. Da sich hierzu am ehesten die Kristallviolettvakzine zu eignen schien, befassten sich mehrere Forscher mit der Herstellung und der Brauchbarkeit dieser Vakzine (Biró [14], Héjj [56], Fehér [44], Csontos und Biró [27], László, Mestyán, Prettenhoffer, Szabó und Tóth [68]).

Auch die sog. *ansteckende Magendarmentzündung der Schweine*, die gelegentlich mit der Schweinepest verwechselt wird, war Gegenstand von Versuchen. Als ein wesentlicher Fortschritt ist hierbei die Erkenntnis zu verzeichnen, dass es sich um eine Krankheit handelt, die in ätiologischer Hinsicht nicht ein-

heitlich ist. Im Gegensatz zu den Erfahrungen von Manninger [79], wonach an der Ätiologie der Krankheit ein Virus beteiligt sein soll, haben nämlich Csontos und Hirt [24, 25] darüber berichtet, dass in ihren Fällen, ebenso wie nach Jelinek in den von ihm in der Tschechoslowakei untersuchten Fällen, die Krankheit durch Leptospiren bedingt war, und dass somit die Krankheit in solchen Fällen als eine Leptospirose aufgefasst werden muss.

Cserey—Pechány, Bélády und Ivánovics [21] gelang es, nicht nur das Virus der *Aujeszkyschen Krankheit* in Gewebekulturen zur Vermehrung zu bringen, sondern auch ein Verfahren auszuarbeiten, womit es möglich geworden ist, die Menge des Virus unter Zugrundelegung seiner gewebezerstörenden Wirkung auch in vitro zu bestimmen.

Zur aktiven Immunisierung gegen die hie und da noch vorkommenden Schafpocken stellte Manninger [75, 76] einen Impfstoff her, der an Aluminiumhydroxydgel adsorbiertes, durch Formalin inaktiviertes Virus enthält Der Impfstoff ist durchaus ungefährlich und erzeugt eine wahrscheinlich lebenslängliche aktive Immunität. Dass er sich auch in der Praxis bewährt hat, ist aus den Arbeiten von Fejér [42] und von Hoffmann [58, 59] bekannt geworden.

Das Virus der *ansteckenden pustulösen Hautentzündung der Schafe und Ziegen* wurde von Oláh und Elek [91, 92] erneut eingehend untersucht. Dabei beschäftigten sie sich auch mit der Ausarbeitung eines Schutzimpfungsverfahrens. Es ist ihnen tatsächlich gelungen, einen Impfstoff herzustellen, der zwar Vorzüge gegenüber den bisher gebräuchlichen aufweist, das Virus aber noch immer in lebender Form enthält.

Mit der *ansteckenden Schweinelähmung* haben sich, obgleich die Krankheit für Ungarn vorderhand ihre praktische Bedeutung verloren hat, ebenfalls mehrere Forscher beschäftigt. So hat insbesondere Héjj [55] wertvolle Angeben über die Lebensfähigkeit des Virus und seine Anwesenheit im Kot kranker Tiere veröffentlicht, während Elek [37] sowie Elek und Kertay [39] aus Hirn und Rückenmark künstlich krankgemachter Schweine Impfstoffe herstellten, die das Virus der Krankheit teils in lebender, teils in durch Formalin inaktivierter Form enthalten. In ihren Versuchen führte die Anwendung dieser Impfstoffe zu Ergebnissen, die mit den bisher bekannt gewordenen ausländischen Erfahrungen übereinstimmen.

Ungarn hat sich der *Tollwut* praktisch vollkommen entledigt, wobei die jährlich wiederholte Schutzimpfung sämtlicher Hunde eine ausschlaggebende Rolle gespielt hat. Gerade die Erfahrungen der Jahre 1945—1949 bestätigten nun, im Gegensatz zur Ansicht einer Reihe von Forschern, auf das glänzendste den Wert des Verfahrens (Manninger [82], Schwanner [102]). Obgleich somit die Krankheit für Ungarn ihre Wichtigkeit verloren hat, beschäftigte sich Kertay [65, 66] sehr richtig dennoch mit den Eigenschaften des fixen Virus, insbesondere mit seiner Glyzerinfestigkeit, und versuchte die postinfektionelle Schutzimpfung der Haustiere zu vereinfachen.

Hinsichtlich des *Virusabortus der Stuten* führte Manninger [80] seine früher in Gemeinschaft mit Csontos begonnenen Versuche fort und kam erneut zu der auch experimentell begründeten Ansicht, dass der Erreger dieser Krankheitsform mit dem Virus der katarrhalischen Influenza der Pferde identisch ist. Ferner lieferte er Beiträge zur Klärung der Pathogenese und der Immunbiologie der Krankheit. Im Verlaufe dieser Versuche gelang es ihm auch nachzuweisen, dass in der Ätiologie der *Druse* in Fällen, in welchen die Krankheit unmittelbar durch ein Virus bedingt wird, als Erreger nicht das Virus der katarrhalischen Influenza, sondern das Virus des ansteckenden Hustens zu betrachten ist [81].

Endlich hat Murányi [88—89] über ein Virus berichtet, das auch in Ungarn an der Ätiologie der *ansteckenden Lungendarmentzündung der Kälber* beteiligt ist; auch gelang es ihm wahrscheinlich zu machen, dass eine *virusbedingte Sinusitis bei Truthühnern* [87] auch in Ungarn vorkommt.

Von den *Erregern der bakteriellen Infektionskrankheiten* hat der *Rotlaufbazillus* (Bacterium rhusiopathiae) die grösste Beachtung erfahren. Zur Reinzüchtung dieser Keimart fand auch Szent Iványi [105, 106] den von anderen bereits empfohlenen Zusatz von Natriumazid zu den Nährböden vorteilhaft. Ferner haben sich Szent Iványi sowie Gelenczei [47, 49] sehr eingehend mit der hämagglutinierenden Wirkung verschiedener Stämme der Rotlaufbazillen befasst, wobei sie besonders die Bedingungen der Erzeugung des hämagglutinierenden Faktors zu ermitteln suchten. Auch haben sie, bisher allerdings noch nicht abgeschlossene, Versuche unternommen zur Entscheidung der Frage, ob es nicht möglich wäre, die hämagglutinationshemmende Wirkung der Rotlaufantikörper zur Wertbestimmung der Schweinerotlaufseren heranzuziehen. Gegenstand von Versuchen war auch die Prüfung des Zusammenhanges zwischen den morphologisch verschiedenen Typen des Rotlaufbazillus und der Virulenz (Manninger [77, 78]), und mehrere Arbeiten befassten sich mit Fragen der aktiven Immunisierung gegen den Schweinerotlauf (Divó [35, 36], Benedek [12], Manninger [77, 78]). Aus ihnen geht hervor, dass es zweckmässig wäre, die bisher allgemein geübte Schutzimpfung der Schweine mit virulenten Impfstoffen zu vermeiden und statt ihnen Vakzinen zu verwenden, die inaktivierte oder avirulente Bakterien enthalten, wobei ihre Wirkung durch die Adsorption des immunisierenden Prinzips an Aluminiumhydroxydgel verstärkt werden könnte.

Mit den Bakterientypen der Gattung *Pasteurella* beschäftigte sich Schneider [100]. Vorderhand reiht er die untersuchten Stämme auf Grund ihres biochemischen Verhaltens in 8 Gruppen ein. Derzsy [34] ist dagegen der Ansicht, dass hinsichtlich ihrer Antigenstruktur bisher bloss zwei Arten voneinander unterschieden werden können, und zwar die klassische Pasteurella multiseptica und die in Transylvanien bei der Büffelseuche nachweisbaren Pasteurellen, für die er die Artbezeichnung Pasteurella Transylvanica geprägt hat.

Zur aktiven Immunisierung der Haustiere gegen *Tetanus* empfehlen Elek, Köves und Szélyes [40] einen Impfstoff, den sie durch Adsorption des Tetanusanatoxins an Aluminiumhydroxydgel herstellen. Sie fanden ihn wesentlich wirksamer als das Anatoxin. Um die Wertbestimmung des im Tetanusheilserum enthaltenen Tetanusantitoxins zu erleichtern, verbesserte Kemény [63, 64] die Flokkulationsprobe und erreichte dadurch, dass man rasch und bequem bestimmen kann, zu welchem Zeitpunkt die Blutflüssigkeit der Serumpferde das Antitoxin in konzentriertester Form enthält.

Csontos [23] beschäftigte sich viel mit dem durch das *Bacterium suipestifer Voldagsen* bedingten Paratyphus der Schweine und gelangte zu dem Ergebnis, dass durch wiederholte Untersuchung des Serums verdächtiger Schweine mit der O-Agglutinationsprobe die Bakterienträger erkannt werden können, während Kucsera [67] zur Prüfung des biochemischen Verhaltens der *Bakterienarten der Paratyphusgruppe* ihre von Tosareff und Wesseliroff ausgearbeitete Züchtung in Mikropipetten gut befunden und empfohlen hat.

Szent Iványi [107] hat durch gründliches Studium eines seuchenhaften Ausbruchs von *Aktinobazillose*, entgegen der Auffassung mancher Autoren, erneut den Beweis dafür erbracht, dass bei Rindern Aktinomyzeten und Staphylokokken nicht primär den Krankheitsvorgang der Aktinobazillose erregen, sondern sich erst nachträglich in dem durch den Aktinobazillus krankgemachten Gewebe ansiedeln, worin sie dann nach dem Absterben der Aktinobazillen die alleinige Flora der Aktinomykome darstellen.

Mehrere Arbeiten beschäftigen sich mit dem Problem der Reinzüchtung der *galterregenden Streptokokken* (Muránvi, Romvári und Temesi [90] u. a.). Als hierzu am geeignetesten zeigte sich ein Nährboden, der aus Kombination des von Chodkowski und Lancaster empfohlenen mit dem Edwardschen hergestellt wird.

Untersuchungen wurden ferner ausgeführt zur Erprobung verschiedener *serodiagnostischer Methoden* und zwecks Verbesserung solcher Verfahren. Abgesehen davon, dass Romváry [93] die allgemein empfohlene *ABR-Probe* zur Ermittelung der Ansteckung mit Brucellen auch in Ungarn mit bestem Erfolg angewendet hat, waren Vizy und Romváry [11] bestrebt, die *Komplementbindungsprobe* auch zur Ermittelung von *Antikörpern in Schweineseren* brauchbar zu machen. Vizy [110] versuchte ausserdem die Komplementbindungsprobe *zur Erkennung der tuberkulösen Ansteckung* bei Rindern durch die Anwendung eines neuartigen Antigenpräparates zu verbessern. Nach seinen Erfahrungen lassen sich jedoch auch hierdurch hauptsächlich nur Fälle von vorgeschrittener Tuberkulose erfassen. Auch fand er die Probe nicht vollauf spezifisch, denn er erhielt positive Reaktionen auch mit dem Serum paratuberkulöser Rinder. Almássy [1] kam zu ähnlichen Ergebnissen auch mit der von Middlebrook und Dubos empfohlenen Hämagglutinationsprobe.

Zur Erkennung der *Beschälseuche* benutzte Vizy [108] die Komplementbindungsprobe, er hatte jedoch bei der Herstellung eines entsprechend wirksamen und dabei haltbaren Trypanosomantigens anfänglich Schwierigkeiten. Es gelang ihm indessen diese Schwierigkeiten zu überwinden und im besonderen auch von künstlich infizierten Hunden in reichlicher Menge Trypanosomen mit guter Antigenwirkung zu erhalten, doch nur dann, wenn er den Tieren das trypanosomenhaltige Blut bereits während des ersten Fieberanfalls entnahm. Gelenczei [45] zeigte übrigens, dass sich im Notfalle, wenn eine Untersuchungsanstalt über einen Stamm des Beschälseucheerregers (Trypanosoma equiperdum) nicht verfügt, auch das in Ratten schmarotzende Trypanosoma lewisi zur Herstellung eines entsprechenden Antigenpräparates verwendet werden kann.

Bei Rindern empfahl Florent zur Ermittelung der Trichomonadose die Komplementbindungsprobe unter Verwendung eines besonders hergestellten Antigenpräparates. Bartha [7, 8] stellte jedoch fest, dass sich die Probe zu diesem Zwecke nicht eignet, denn die positiven Reaktionen beruhen auf einer nichtspezifischen antikomplementären Wirkung gewisser Rinderseren. Mit der *nichtspezifischen antikomplementären Wirkung* des Serums der verschiedenen Tierarten beschäftigten sich Manninger und seine Mitarbeiter schon längere Zeit hindurch, eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist jedoch erst 1947 möglich geworden [70, 71.] Es zeigte sich, dass die antikomplementäre Wirkung einer jeden Serumart vom Werte des Eiweissquotienten bestimmt wird. Dieser Zusammenhang tritt jedoch nur bei jenen Serumarten klar zutage, durch deren normale hämolytische Fähigkeit die Funktion des hämolytischen Systems nicht gesteigert wird. In Fällen, wo diese Bedingung nicht erfüllt ist, wird die auf Grund des Eiweissquotienten erwartete antikomplementäre Wirkung durch die normale hämolytische Tätigkeit des Serums verschleiert.

Endlich versuchte Holló [62] zur *Steigerung des Komplementgehaltes* des normalen Meerschweinchenserums die Tiere mit dem unter dem Namen Resactor in den Verkehr gelangenden embyronalen Leberauszug zu behandeln. Nach seinen Erfahrungen vermag dieses Präparat durch Reizung des retikuloendothelialen Apparates tatsächlich auch den Komplementgehalt des Serums wesentlich zu erhöhen.

In dem Mitgeteilten versuchte ich eine Skizze über die 6jährige Arbeit der ungarischen veterinärmedizinischen Mikrobiologien zu entwerfen, selbstverständlich an der Hand der Arbeiten, die bereits in Zeitschriften veröffentlicht worden sind. Mein Referat wäre indessen unvollständig, würde ich nicht auch darauf hinweisen, dass in den Instituten, die sich mit Fragen der veterinärmedizinischen Mikrobiologie beschäftigen, im vergangenen Jahre noch eine weitere Reihe von Problemen behandelt wurde. Mit einem Teile der diesbezüglichen Versuchsergebnisse werden wir schon im Laufe dieses Kongresses bekannt werden, den übrigen werden wir voraussichtlich alsbald in Zeitschriften begegnen.

LITERATUR

1. *Almássy K.:* Haemagglutinációs próba a gümőkóros fertőzöttség felismerésére. (Hämagglutinationsprobe zur Erkennung der tuberkulösen Ansteckung.) MÁL. 201. (1951).

2. *Bamberger K.:* A haemagglutinációs próba és jelentősége a baromfipestis diagnosztizálásában. (Die Hämagglutinationsprobe und ihre Bedeutung in der Diagnose der Geflügelpest.) MÁL. 362. (1948.)

3. *Bamberger K.:* Adatok a csökkent virulentiájú baromfipestis vírustörzsek biológiájához és ezek gyakorlati vonatkozásai. (Beiträge zur Biologie der Geflügelpest. Virusstämme von verminderter Virulenz und deren praktische Beziehungen.) MÁL. 373. (1949.)

4. *Bamberger K.:* Kísérletek baromfipestis elleni hyperimmun vérsavó előállítására emlős háziállatoknál. (Versuche zur Herstellung von Hyperimmunseren aus Haussäugetieren gegen Geflügelpest.) MÁL. 137. (1950.)

5. *Bamberger K.:* A baromfipestis elleni immunitás kezdete és tartama különböző eljárásokkal immunizált növendéktyúkfélékkel. (Beginn und Dauer der Immunität gegen Geflügelpest bei den mit verschiedenen Verfahren immunisierten Junghühnern.) MÁL. 225. (1950.)

6 *Bálintfi I.:* A baromfispirochaetosis orvoslása penicillinnel (Die Heilung der Geflügelspirochätose mit Penicillin.) MÁL. 269. (1950.)

7. *Bartha A.:* Adatok a Trichomonas fetus biológiájához. (Beiträge zur Biologie von Trichomonas fetus.) MÁL. 142. (1950.)

8. *Bartha A.:* Beitrag zur Biologie von Trichomonas fetus. AVA. 35. (1951.)

9. *Bartha A.:* Adat a szarvasmarha trichomonadosisának szérodiagnosztikájához. (Beitrag zur Serodiagnostik der Trichomonadose der Rinder.) MÁL. 166. (1951.)

10. *Bartha A.:* Contributions to the serodiagnostic of Trichomonadosis in cattle. AVA. 223. I. (1951.)

11. *Benedek L., Bugyáki L., Kollonay E., Szent Iványi T., Darvas J.:* Másodlagos kórokozók szerepe a sertéspestis elleni szimultán oltásokkal kapcsolatos oltási balesetek alkalmával. (Über die Rolle der sekundären Krankheitserreger bei den Impfzufällen der simultanen Impfung gegen Schweinepest.) MÁL. 162. (1947.)

12. *Benedek L.:* Sertésorbánc elleni immunizálási kísérletek. (Immunisierungsversuche gegen Schweinerotlauf.) MÁL. 74. (1949.)

13. *Benedek L. und Tóth B.:* Baromfipestis elleni védekezés kötelező oltásokkal. (Bekämpfung der Geflügelpest mit obligatorischen Impfungen.) MÁL. 193. (1950.)

14. *Bíró J.:* Immunizálási kísérletek a sertéspestis elleni kristályibolya-vakcinával. (Immunisierungsversuche gegen Schweinepest mit Kristallviolettvakzine.) MÁL. 242. (1947.)

15. *Bodon L. und Csontos L.:* A baromfipestis H (Hertfordshire)-vírus elszaporítása különféle helyre oltott tojásokban. (Vermehrung des Geflügelpest »H« Virus in den verschiedenen Teilen der bebrüteten Hühnereier.) MÁL. 263. (1951.)

16. *Buzna D.:* A hőmérséklet befolyása az ú. n. »H« baromfipestisvírus élettartamára. (Einfluss der Temperatur auf die Lebensdauer des sogenannten Geflügelpestvirus »H«.) MÁL. 217. (1950.)

17. *Buzna D.:* A »H« vírussal kezelt baromfi ürít-e fertőzőképes vírust? (Scheidet das mit dem Virus »H« behandelte Geflügel ansteckungsfähiges Virus aus?) MÁL. 104. (1951.)

18. *Buzna D. und Hódossy J.:* Immunizálási kísérletek a baromfipestis elleni »H« vakcinával, különös tekintettel az interferenciára. (Immunisierungsversuche gegen Geflügelpest mit der »H« Vakzine, mit besonderer Rücksicht auf die Interferenz.) MÁL. 133. (1951.)

19. *Buzna D. und Hódossy J.:* The time required for the development of Hertfordshire vaccine. AVA. I. 107. (1951.)

20. *Buzna D. und Horváth Gy.:* Tyúkból termelt baromfipestis elleni szérum értéke. (Über den Wert des von Hühner erzeugten Serums gegen Geflügelpest.) MÁL. 4. (1949.)

21. *Cserey-Pechány É., Béládi I. und Ivánovics Gy.:* Az Aujeszky-féle pseudorabiesvírus titrálása szövetkultúrák segítségével. (Titration des Aujeszkyschen Pseudorabies-Virus mit Hilfe von Gewebekulturen.) MÁL. 311. (1950.)

22. *Csontos J.:* Adatok a sertéspestis elleni szimultán oltás eredménytelenségéhez. (Beiträge zur Frage der Erfolglosigkeit der Simultanimpfung gegen Schweinepest.) MÁL. 85. (1946.)

23. *Csontos J.:* Adatok a Voldagsen-paratyphus elleni védekezéshez. (Beiträge zur Bekämpfung des Voldagsen-Paratyphus.) MÁL. 321. (1950.)

24. *Csontos J. und Hirt G.:* Adatok a sertés fertőző gyomorbélgyulladásának oktanához. (Beiträge zur Ätiologie der ansteckenden Magendarmentzündung der Schweine.) MÁL. 97. (1951.)

25. *Csontos J. und Hirt G.:* Recherches experimentales sur l'étiologie de la gastro-entérite infectieuse des porcs. AVA. I. 205. (1951.)

26. *Csontos J., Hirt G., Köves J. und Manninger R.:* Egységes-e immunbiologiai szempontból a sertéspestis vírusa? (Ist das Virus der Schweinepest immunbiologisch einheitlich?) MÁL. 354. (1950.)

27. *Csontos J. und Biró J.:* A kristályibolya-vakcina és a sertéspestis elleni szérum kombinált alkalmazása a sertéspestis elleni védekezésben. (Kombinierte Anwendung von Kristallviolettvakzine und Serum in der Bekämpfung der Schweinepest.) MÁL. 365. (1950.)

28. *Csontos J. und Hódossy J.:* Adatok a baromfipestis elleni védekezéshez oltásokkal. (Beiträge über die Bekämpfung der Geflügelpest durch Impfungen.) ÁK. 7. (1948.)

29. *Csörsz Aladár:* Immunizálási kísérletek baromfipestissel. (Immunisierungsversuche mit Geflügelpest.) MÁL. 106. (1948.)

30. *Csörsz A.:* Immunizálási kísérletek baromfipestissel. (Immunisierungsversuche mit Geflügelpest.) MÁL. 215. (1948.)

31. *Csörsz A.:* Manuskript.

32. *Csörsz A.:* Immunizálási kísérletek baromfipestissel. (Immunisierungsversuche mit Geflügelpest.) MÁL. 117. (1950.)

33. *Csörsz A.:* Immunizálási kísérletek baromfipestissel. (Immunisierungsversuche mit Geflügelpest.) MÁL. 213. (1950.)

34. *Derzsy D.:* Pasteurella-fajok elkülönítése. (Differenzierung von Pasteurella-Stämmen.) MÁL. 69. (1948.)

35. *Divó A.:* Sertésorbánc elleni immunizáló kísérletek sertéseken és galambokon formalinnal elölt és alumíniumhydroxydhoz adszorbeált oltóanyagokkal. (Immunisierungsversuche gegen Schweinepest bei Schweinen und Tauben mit durch Formalin getöteten und an Aluminiumhydroxyd adsorbierten Impfstoffen.) MÁL. 18. (1949.)

36. *Divó A.:* Sertésorbánc elleni immunizálási kísérletek laboratóriumi kísérleti állatokon és részben sertéseken. (Immunisierungsversuche gegen Schweinepest bei Laboratoriumstieren und Schweinen.) MÁL. 129. (1950.)

37. *Elek P.:* Fertőző sertésbénulás elleni védőoltási kísérletek. (Schutzimpfungversuche gegen ansteckende Schweinelähmung.) MÁL. 361. (1949.)

38. *Elek P.:* A fertőző sertésbénulás. (Die ansteckende Schweinelähmung.) MÁL. 163. und 206. (1950.)

39. *Elek P. und Kertay N.:* Kísérletek fertőző sertésbénulás elleni védőoltás kidolgozására. (Versuche zur Ausarbeitung einer Schutzimpfung gegen ansteckende Schweinelähmung.) MÁL. 354. (1951.)

40. *Elek P., Köves J., und Szélyes L.:* A tetanusz elleni aktív immunizálás. (Aktive Immunisierung gegen Tetanus.) MÁL. 67. (1951.)

41. *Elek P. und Prokopovitsch:* Kísérletek a baromfipestis vírusának módosítására sorozatos galamboltással. (Versuche zur Modifikation des Geflügelpestvirus durch Taubenpassagen.) MÁL. 323. (1950.)

42. *Fehér T.:* Hozzászólás a sertéspestis elleni szimultánozás eredménytelenségének kérdéséhez. (Bemerkung zur Frage der Erfolglosigkeit der Simultanimpfung gegen Schweinepest.) MÁL. 136. (1947).

43. *Fehér T.:* Fertőzött juhállományok oltása Manninger-féle ovinával. (Impfung von verseuchten Schafbeständen mit der Manningerschen Ovina.) MÁL. 36. (1949.)

44. *Fehér T.:* A sertéspestis allergiás kórformái. (Allergische Krankheitsbilder der Schweinepest.) MÁL. 356. (1950).

45. *Gelenczei E.:* Kísérletek a tenyészbénaság szerológiai kimutatására alkalmas trypanosomaantigén előállítására. (Versuche zur Herstellung eines zum serologischen Nachweis der Beschälseuche geeigneten Trypanosomantigens.) MÁL. 37. (1947).

46. *Gelenczei E.:* A haemagglutinatiót gátló próba gyakorlati diagnosztikai értékéről baromfipestis esetén. (Über den praktischen diagnostischen Wert der Hämagglutinationhemmungsprobe bei Geflügelpest.) MÁL. 233. (1949.)

47. *Gelenczei E.:* A sertésorbáncbacillusok haemagglutinációs képességének vizsgálata. (Untersuchung der Hämagglutinationsfähigkeit der Schweinerotlaufbazillen.) MÁL. 257. (1950.)

48. *Gelenczei E.:* Állandó volt-e a magyarországi baromfipestisjárvány vírusának immunbiológiai viselkedése? (War das immunbiologische Verhalten des Virus der ungarischen Geflügelpestepidemie konstant?) MÁL. 1. (1951).

49. *Gelenczei E. und Szent Iványi T.:* Zur Hämagglutinationsfähigkeit der Rotlaufbazillen. AVA. I. 55. (1951).

50. *Hegyeli Z.:* Baromfipestis vírusával végzett fertőzési kísérletek galambokon. Ansteckungsversuche an Tauben mit dem Virus der Geflügelpest.) MÁL. 18. (1947.)

51. *Hegyeli Z.:* Sertésből és libából termelt baromfipestis elleni szérum értékének meghatározása élő vírussal végzett szimultán oltással. (Bestimmung des Wertes aus Schweinen und

Gänsen erzeugten Geflügelpestserums durch Simultanimpfungen mit lebendem Virus.) Ák. I. 47. (1948.)

52. *Hegyeli Z.:* Sertésből és libából termelt baromfipestis elleni kísérleti szérum virulicid hatásának vizsgálata. (Untersuchung der viruliziden Wirkung des experimentellen Schweine- und Gänse-Serums gegen Geflügelpest.) MÁL. 66. (1948.)

53. *Hegyeli Z.:* Adatok a sertésből termelt kísérleti baromfipestis elleni szérum gyakorlati alkalmazásához. (Beiträge zur praktischen Anwendung des aus Schweinen erzeugten Serums gegen experimentelle Geflügelpest.) MÁL. 43. (1949.)

54. *Hegyeli Z.:* Immunbiológiai vizsgálatok galambokon a baromfipestis vírusával. (Immunbiologische Untersuchungen an Tauben mit dem Geflügelpestvirus.) MÁL. 296. (1951.)

55. *Héjj J.:* A fertőző sertésbénulás kóroktanára vonatkozó gyakorlati megfigyelések és kísérletek. (Praktische Beobachtungen und Versuche über die Ätiologie der ansteckenden Schweinelähmung.) MÁL. 2. (1947.)

56. *Héjj J.:* Sertéspestis elleni szimultán oltás kristályvakcina alkalmazásával. (Simultanimpfung gegen Schweinepest mit Kristallviolettvakzine.) MÁL. 265. (1949.)

57. *Hodossy J.:* Immunizálási kísérletek baromfipestis ellen a Hertfordshire vírussal. (Immunisierungsversuche gegen Geflügelpest mit dem Hertfordshire Virus.) MÁL. 280. (1949.)

58. *Hoffmann F.:* Beszámoló a Phylaxovinával végzett oltásokról a gyakorló kartársak megfigyelései alapján. (Bericht über die Impfungen mit Phylaxovina auf Grund der Beobachtungen der praktizierenden Kollegen.) MÁL. 196. (1949.)

59. *Hoffmann F.:* Praktische Erfahrungen mit dem Schafpockenimpfstoff Phylaxovina. AVA. I. 23. (1951.)

60. *Horváth Gy.:* Az immunitás tartamának megállapítása csökkent virulenciájú élő vírussal (Hertfordshire) történő oltás után. (Bestimmung der Immunitätsdauer nach Impfung mit lebendem (Hertfordshire) Virus von verminderter Virulenz.) MÁL. 107. (1951.)

61. *Horváth Gy.:* Gyors eljárás a Hertfordshire vírussal történt oltás hatásosságának megállapítására. (Schnellverfahren zur Bestimmung der Wirksamkeit der Impfung mit dem Hertfordshire Virus.) MÁL. 226. (1951.)

62. *Holló S.:* Megfigyelések a tengerimalac-vérsavó komplementum hatékonyságának Resactor alkalmazása utáni változásáról. (Beobachtung über die Änderung der Wirksamkeit des Meerschweinchenserum-Komplementes nach Anwendung von Resactor.) MÁL. 163. (1951.)

63. *Kemény L.:* A flocculatiós próba alkalmazása tetanusnál. (Die Anwendung der Flocculationsprobe bei Tetanus.) MÁL. 200. (1950.)

64. *Kemény L.:* Die Anwendung der Flocculationsprobe bei Tetanus. AVA. I. 163. (1951.)

65. *Kertay N.:* A háziállatok veszettség elleni sorozatos védőoltásának újabb egyszerűsítése. (Neuere Vereinfachung der Serienschutzimpfung gegen Tollwut der Haustiere.) MÁL. 50. (1946.)

66. *Kertay N.:* A glycerin hatása a veszettség fix vírusára. (Wirkung des Glyzerins auf das fixe Virus der Tollwut.) MÁL. 274. (1949.)

67. *Kucsera Gy.:* Baktériumtenyésztés és identifikálás mikropipettákban. (Bakterienzüchtung und Identifikation in Mikropipetten.) MÁL. 147. (1950.)

68. *László S., Mestyán A., Prettenhoffer Z., Szabó J. und Tóth S.:* A sertéspestis elleni kristályvibolya-vakcinás oltás 1 éves tapasztalatai a nagytétényi sertéshízlaló telepen. (Erfahrung mit Kristallviolettvakzine gegen Schweinepest während eines Jahres in der Nagytétényer Schweinemastanstalt.) MÁL. 324. (1951.)

69. *Manninger R.:* Megjegyzések a sertéspestis elleni kórelőző szimultán oltás kérdéséhez. (Bemerkungen zur Frage der präventiven Simultanimpfung gegen Schweinepest.) MÁL. 82. (1946.)

70. *Manninger R.:* The anticomplementary action of sera in relation to their protein quotient. Fourth International Congress for Microbiology, Copenhagen 1947.

71. *Manninger R.:* A vérsavók komplementumellenes hatásának összefüggése fehérjehányadosukkal. (Zusammenhang zwischen der antikomplementären Wirkung der Blutseren und ihrem Eiweissquotienten.) ÁK. I. 109. (1948.)

72. *Manninger R.:* Helyénvaló-e baromfipestisnek nevezni a mostani baromfijárványt? (Kann man die gegenwärtige Geflügelepidemie mit Recht Geflügelpest nennen?) MÁL. 2. (1949.)

73. *Manninger R.:* Zur Geschichte der Geflügelpest. AVA. I. 98. (1949.)

74. *Manninger R.:* Paratyphus vagy szövődményes sertéspestis. (Paratyphus oder Schweinepest mit Komplikationen.) MÁL. 2. (1948.)

75. *Manninger R.:* Új juhhimlő elleni oltóanyag. (Neuer Impfstoff gegen Schafpocken.) MÁL. 34. (1948.)

76. *Manninger R.:* A new vaccine against sheep pox. AVH. I. 43. (1948.)

77. *Manninger R.:* A sertésorbánc elleni aktív immunizálás új módszere. (Neue Methode der aktiven Immunisierung gegen Schweinerotlauf.) MÁL. 322. (1949).

78. *Manninger R.:* Über eine Methode der aktiven Immunisierung gegen Schweinerotlauf. AVA. I. 5. (1951.)

79. *Manninger R.:* Infectious gastroenteritis of swine. AVA. I. 1. (1951.)

80. *Manninger R.:* Studies on infectious abortion in mares due to a filterable virus. AVA. I. 62. (1949.)

81. *Manninger R.:* Zur Ätiologie der Pferdedruse. AVA. I. 73. (1949.)

82. *Manninger R.:* La prophylaxie de la rage. Bulletin de l'Office International des Epizooties, XXXIV. 97. (1950.)

83. *Manninger R.:* A sertéspestisről. (Über die Schweinepest.) MÁL. 193. (1951.)

84. *Marcis Á. und Almássy K.:* Újabb adatok az alumíniumhydroxyddal készült baromfipestis-vakcina gyakorlati kipróbálásáról. (Neuere Beiträge über die praktische Erprobung der mit Aluminiumhydroxyd erzeugten Geflügelpest-Vakzine.) MÁL. 82. (1949.)

85. *Medgyesi Gy.:* Vizsgálatok a baromfipestis (Newcastle) virus haemagglutináló képességével kapcsolatban. (Untersuchungen über die Hämagglutinationsfähigkeit des (Newcastle) Geflügelpestvirus.) MÁL. 110. (1951.)

86. *Murányi F.:* Pulykák szemgödöralatti üregének fertőző gyulladása. (Ansteckende Sinusitis bei Truthühnern.) MÁL. 19. (1950.)

87. *Murányi F.:* Új szelektív táptalaj a fertőző hurutos tőgygyulladás kórokozójának kimutatására. (Neuer selektiver Nährboden zum Nachweis der Erreger der ansteckenden katarrhalen Euterentzündung.) MÁL. 150. (1950.)

88. *Murányi F.:* A borjak fertőző tüdő- és bélgyulladása. (Über die ansteckende Lungendarmentzündung der Kälber.) MÁL. 303. (1950.)

89. *Murányi F.:* Zur Ätiologie der ansteckenden Lungendarmentzündung der Kälber. AVA. I. 111. (1951.)

90. *Murányi F., Romváry J. und Temesi Z.:* A baromfipestis elleni védekezés oltásokkal. (Bekämpfung der Geflügelpest durch Impfungen.) MÁL. 226. (1947.)

91. *Oláh P. und Elek P.:* Kísérletek a juhok és kecskék fertőző hólyagos bőrgyulladásának (varas szájfájás) vírusával oltóanyag előállítására. (Versuche mit dem Virus der ansteckenden pustulösen nekrotisierenden Hautentzündung der Schafe und Ziegen zur Herstellung eines Impfstoffes.) MÁL. 109. (1951.)

92. *Oláh P. und Elek P.:* Élő vírust tartalmazó oltóanyag juhok és kecskék fertőző hólyagos bőrgyulladása (varas szájfájás) ellen. (Ein lebendes Virus enthaltender Impfstoff gegen die ansteckende pustulöse nekrotisierende Hautentzündung der Schafe und Ziegen.) MÁL. 328. (1951.)

93. *Romváry J.:* Az ABR-próba értéke a brucellosisos fertőzések felismerésében. (Über den Wert der ABR-Probe zur Erkennung der Ansteckung mit Brucellen.) MÁL. 234. (1950).

94. *Romváry J., Benedek L., Hollósvölgyi F. und Környei I.:* A fertőző hurutos tőgygyulladás laboratóriumi diagnosztizálása. (Laboratoriumsdiagnostik der ansteckenden katarrhalen Euterentzündung.) MÁL. 228. (1951.)

95. *Szakmáry G.:* A baromfipestis-vírus nagyarányú termelése. (Massenproduktion des Geflügelpestvirus.) MÁL. 199. (1949.)

96. *Szakmáry G.:* A baromfipestis H-vírus lyophilizálása. (Lyophiliserung des Geflügelpestvirus »H«.) MÁL. 301. (1951.)

97. *Schneider L.:* A baromfipestis elleni szérum és a baromfipestis-vakcina értéke és használhatósága. (Über Wert und Brauchbarkeit des Serums und der Vakzine gegen Geflügelpest.) MÁL. 5. (1946.)

98. *Schneider L.:* A baromfipestis elleni oltóanyagok előállításának feltételei. (Über die Bedingungen der Herstellung der Impfstoffe gegen Geflügelpest.) MÁL. 34. (1946).

99. *Schneider L.:* A baromfipestis elleni oltás gyakorlati eredményei. (Praktische Ergebnisse mit den Impfungen gegen Geflügelpest.) MÁL. 82. (1947.)

100. *Schneider L.:* Additional data to the aetiology of pasteurellosis with special reference to different species of hosts. AVA. I. 31. (194?.)

101. *Schneider L.:* A baromfipestis vírusok és szérumok hatáscsökkenése raktározás közben. (Über die Abnahme der Wirkung von Geflügelpestviruspräparaten und von Geflügelpestseren während ihrer Lagerung.) MÁL. 170. (1951.)

102. *Schwanner J.:* Preventive vaccination of dogs as a method of eradication of rabies. Report of the XIVth International Veterinary Congress London, 1949. II. 543.

103. *Sinkovits J.:* A baromfipestis- (Newcastle) vírus viselkedése egértüdőben. (Verhalten des Geflügelpestvirus (Newcastle) in der Mäuselunge.) MÁL. 359. (1949.)

104. *Szent Iványi T.:* Paratyphusbaktériumok szerepe a szedett sertések szállásbetegségeinek oktanában. (Bedeutung der Paratyphusbakterien in den Mastanstalt-Erkrankungen der gesammelten Schweine.) MÁL. 311. (1947.)

105. *Szent Iványi T.:* Elkülönítő táptalaj a sertésorbáncbaktérium és a tőgygyulladást okozó streptococcusok kitenyésztésére. (Differenzialnährboden zur Züchtung der Schweinerotlaufbazillen und der Euterentzündung verursachenden Streptokokken.) MÁL. 336. (1951.)

106. *Szent Iványi T.:* Über einen Spezialnährboden zur Züchtung von Rotlaufbazillen und Galtstreptokokken. AVA. I. 229. (1951.)

107. *Szent Iványi T.:* Adatok a sugárgombabetegség kóroktanához. (Beiträge zur Ätiologie der Aktinobazillose.) MÁL. 116. (1951.)

108. *Vizy L.:* A tenyészbénaság szérodiagnosztikája. (Die Serodiagnostik der Beschälseuche.) MÁL. 34. (1947.)

109. *Vizy L.:* A tenyészbénaság vérvizsgálat útján való felismerésének nehézségei. (Schwierigkeiten der Erkennung der Beschälseuche durch Blutuntersuchung.) MÁL. 35. (1950.)

110. *Vizy L.:* A komplementumkötési próba jelentősége a szarvasmarha gümőkórjának felismerésében. (Bedeutung der Komplementbindungsprobe zur Erkennung der Tuberkulose der Rinder.) MÁL. 129. (1951.)

111. *Vizy L. und Romváry J.:* Komplementumkötés sertésvérsavóval. (Komplementbindung mit Schweineblutserum.) MÁL. 85. (1949).

Abkürzungen bei der Benennung der Zeitschriften: MÁL. Magyar Állatorvosok Lapja, ÁK. Állatorvostudományi Közlemények, AVH. Acta Veterinaria Hungarica, AVA. Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae.

NEUERE ERGEBNISSE DER VIRUSFORSCHUNG IN UNGARN

G. IVÁNOVICS

Institut für Mikrobiologie der Medizinischen Universität, Szeged

An der im September 1948 abgehaltenen Medizinischen Zentenarfestwoche wurde bereits kurz über die Traditionen der Virusforschung in Ungarn sowie über ihre Aufgaben während der unmittelbar auf die Befreiung des Landes folgenden Periode berichtet. Seither sind einige Jahre verflossen, in denen zuerst die Schaffung des Wissenschaftlichen Rates, dann die Reorganisation der Ungarischen Akademie der Wissenschaften und die sich eng an unseren volkswirtschaftlichen Fünfjahrplan anschmiegende, planmässigere wissenschaftliche Arbeit die Meilensteine bedeuteten, welche den Fortschritt der Virusforschung in Ungarn bezeichnen. Vor allem waren es aber die von der Regierung zur Verfügung gestellten gewaltigen Summen, die es ermöglichten, mit den modernsten Methoden an die Forschungsaufgaben heranzutreten. Auch das Elektronenmikroskopische Institut der Ungarischen Akademie der Wissenschaften bot — obzwar es nicht nur der Virusforschung dient — die Möglichkeit, einzelne zeitgemässe Fragen auf dem Gebiete der Virusforschung zu untersuchen

Der vorliegende Bericht erstreckt sich zwar auf sämtliche Probleme der Virusforschung in Ungarn während des Zeitabschnitts nach der Befreiung, da aber Akademiker *Manninger* die veterinärmedizinischen Fragen ausführlich vor der tierärztlichen Sektion des Kongresses und Ing. *Pelc* die Ergebnisse auf dem Gebiete der Pflanzenvirusforschung im Rahmen des Eröffnungsvortrages der Sektion für landwirtschaftliche und industrielle Mikrobiologie behandeln werden, sollen die Ereignisse in diesen beiden Forschungssektoren nur kurz gestreift und hier nur die mit den humanmedizinischen oder mit den allgemeinen Fragen der Virusforschung zusammenhängenden Resultate eingehender geschildert werden. Es ist anzunehmen, dass der vorliegende Bericht nicht alle Interessenten restlos befriedigen wird, doch erschwerte die Vielschichtigkeit der Fragen die Zusammenstellung dieses Referates in mehrfacher Beziehung. Natürlich wird das in der Sektion für Virusforschung in Form von Vorträgen behandelte Material hier nur gestreift werden können, da der Text der meisten im Programm aufgenommenen Vorträge zum Zeitpunkt der Zusammenstellung dieses Berichtes nicht zur Verfügung stand. Weiters werden hier auch die an

den humanen Abteilungen der Staatlichen Impfstoffinstitute im Gange befindlichen und nicht veröffentlichten Arbeiten nicht berücksichtigt, doch wurden im Laufe der letzten Jahre — wenn ich recht unterrichtet bin — von diesen Instituten keine bedeutenderen Virusstudien publiziert

In der Periode nach dem Kriege wurden in folgenden, sich mit Aufgaben der Virusforschung beschäftigenden Instituten Untersuchungen in Angriff genommen. Zuerst sei die Virusforschungsabteilung des Staatlichen Instituts für Volksgesundheitswesen in Budapest erwähnt, wo nach der Verschmelzung des Influenzalaboratoriums mit den Laboratorien, die Impfstoffe gegen Typhus exanthematicus und gegen Lyssa herstellten, zu einem einzigen Forschungsinstitut, sehr erfolgreiche Virusforschungen ausgeführt wurden. Die im Mikrobiologischen Institut der Medizinischen Universität Budapest in den Nachkriegsjahren unter der Leitung von *Berta* aufgenommenen Arbeiten erlitten infolge des frühen Ablebens dieses jungen, zu den besten Hoffnungen berechtigenden Forschers eine Unterbrechung, so dass in diesem Institut in den letzten zwei Jahren die Virusforschungen stillstanden. Es ist zu hoffen, dass der neue Direktor des Instituts — nach Sicherstellung der entsprechenden Arbeitskräfte — sich wiederum den Aufgaben der Virusforschung zuwenden wird.

Am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Medizinischen Universität Szeged beschäftigt man sich erst seit 1948 mit Virusforschungen ; die Einrichtung des Instituts, seine Erweiterung durch Erstellung eines Neubaus im Zuge des Dreijahrplanes gewährleisten heute bereits in allem eine erfolgreiche Forschungsarbeit. An der Dermatologischen Klinik in Pécs arbeitet Professor *Melczer* an der Lösung einiger dermatologischer Virusforschungsaufgaben.

In der Nachkriegsperiode waren die bedeutenderen humanmedizinischen Aufgaben und die auf diesem Gebiete erzielten Ergebnisse folgende :

Die Resultate, die auf dem Gebiet eines der aktuellsten Virusforschungsaufgaben, auf dem der epidemischen Influenza erreicht werden konnten, schliessen sich — meiner Ansicht nach — würdig an die ausländischen Forschungsergebnisse an. Wie jede naturwissenschaftliche Arbeit experimentellen Charakters, ist auch die Influenzaforschung in erster Linie eine methodische Frage, und die ungarischen Forscher haben auf diesem Gebiet überaus gute Erfolge zu verzeichnen. Hier müssen vor allem die Ergebnisse von *Takátsy* hervorgehoben werden, welche die in der Sowjetunion von *Narzissow* empfohlene hohlgeschliffene Objektträgermethode durch Verwendung der *Mandula*schen hohlgeschliffenen Glasscheiben weiterentwickelten. Des weiteren vereinfachte *Takátsy* durch das von ihm ausgearbeitete einfache Verdünnungsverfahren die Hämagglutinations- und Komplementbindungsarbeiten in einem solchen Ausmass, dass nicht nur eine beträchtliche Ersparnis an Arbeitskraft, sondern auch an Material erzielt werden konnte. Was diese Methode für jemanden bedeutet, der täglich eine grosse Zahl von Titrierungen durchzuführen hat, konnten wir selbst fest-

stellen, als diese Methode auch in dem unter meiner Leitung stehenden Institut eingeführt wurde.

Der hohe Stand der personellen und materiellen Arbeitsbedingungen der Virusforschungsabteilung des Staatlichen Instituts für Volksgesundheitswesen ermöglichte eine weit erfolgreichere und ausgedehntere Erforschung der Influenzaepidemie des Jahres 1950/51 als bisher. Zuvor hatte die Abteilung auch im Laufe der Epidemie des Jahres 1949 erfolgreiche Isolierungsversuche ausgeführt und vier A- und B-Influenzastämme aus Erkrankungen in Budapest und im Dorfe Valkó isoliert. Im Zusammenhang mit der Epidemie des Jahres 1950/51 stellte *Petrilla* fest, dass in den Monaten Januar und Februar in einzelnen Gegenden des Landes kleinere Herde auftraten, während in Budapest lediglich sporadisch einige leichtere Erkrankungen vorkamen. Im Laufe der Epidemie versuchten *Dömök*, *Farkas* und *Gál* aus insgesamt 90 Rachenspülflüssigkeiten und 5 Sezierungsmaterialien durch amniale Impfung das Virus zu isolieren. Es gelang ihnen auf diese Weise insgesamt 12 Influenzastämme zu gewinnen, von denen eines dem B-Typus angehörte, während die übrigen dem A'-Subtypus am nächsten standen. Die in Budapest isolierten Stämme waren in bezug auf ihre Antigenstruktur identisch, während der einzige in der Provinz isolierte Stamm von den Budapester Stämmen abwich. Die Budapester Stämme standen mit den im selben Jahr in Nordwesteuropa isolierten Stämmen in naher Verwandtschaft. Ausser der Isolierung und der Untersuchung der Antigenstruktur der Virusstämme wurden durch die Prüfung einer grossen Zahl von Seren von Rekonvaleszenten auch wertvolle epidemiologische Angaben ermittelt.

Im März 1949 trat auch in Szeged eine kleinere Influenzaepidemie auf, wobei versucht wurde, aus einigen Rachenspülflüssigkeiten das Virus nachzuweisen. Diese Versuche blieben indessen erfolglos. Im Zusammenhang damit soll auch auf einen Umstand hingewiesen werden, der im Laufe der Virusforschungsarbeiten in unseren Universitätsinstituten bei der Untersuchung epidemiologischer Fragen in Rechnung zu stellen ist, nämlich der Mangel einer entsprechenden Organisation. Die Universitätsinstitute sind derart anderwärtig in Anspruch genommen, dass sie ihre Beziehungen zu den übrigen Volksgesundheitsorganen nicht in zufriedenstellender Weise auszubauen vermochten, was wieder zur Folge hat, dass bei Epidemien die Einsammlung des Untersuchungsmaterials nur unvollkommen sein wird. Die Bedeutung der Influenzafrage würde es verdienen, dass die Vorbedingungen für eine pathologische und epidemiologische Erforschung dieser Infektionskrankheit ausser an der Virusforschungsabteilung des Staatlichen Institutes für Volksgesundheitswesen auch in irgendeinem Provinzzentrum geschaffen würden.

Über die Frage der Hämagglutination des Influenzavirus sind im vergangenen Jahre zwei grössere Studien erschienen. *Farkas* charakterisierte die von ihm untersuchten mehreren Influenzastämme sowie Hühnerpest- und Mumpsviren durch die Erforschung ihrer Hämagglutinations- und Rezeptoren-

blockierungsenzyme. In Szeged wurden neue Angaben über den Virusrezeptorenstoff der roten Blutkörperchen verschiedener Tierarten veröffentlicht. Es wurde festgestellt, dass die Virusadsorptionsfähigkeit der roten Blutkörperchen ein besseres Bild über das Vorkommen des Rezeptorenstoffes vermittelt als die Hämagglutination, da diese wegen zahlreicher, manchmal nicht vermeidbarer Versuchsfaktoren nicht immer unter identischen Verhältnissen durchgeführt werden kann. Über die Ergebnisse von systematischen Forschungen über den Rezeptorenstoff des Lungenepithels verschiedener Tierarten soll von den Mitarbeitern des Szegeder Mikrobiologischen Institutes im Rahmen der Vorträge dieser Sektion berichtet werden. Über die theoretische und praktische Bedeutung der einfachen Methode von *Takátsy* zur Konzentrierung des Influenzavirus wird man sich im Rahmen der hier zu hörenden Vorträge ein gutes Bild machen können.

Als positives Ergebnis der Untersuchungen der mit der Influenza verwandten Viren, wie Hühnerpest- und Mumpsvirus, ist zu werten, dass es gelang, in Ungarn mehrere Mumpsstämme zu isolieren und dass die Feststellung gemacht wurde, dass das *Radnót*sche sog. oculo-glandulare Syndrom durch das Hühnerpestvirus hervorgerufen wird. Mit einer gewissen Kritik sind dagegen die Mitteilungen aufzunehmen, die sich auf das Verhalten des Hühnerpestvirus in Mäuselungen beziehen.

Berta, *Molnár* und *Garay* untersuchten die Wirkung von Ultraschall auf das Influenzavirus, wobei sie feststellten, dass die Hämagglutinierbarkeit der PR 8-Virus enthaltenden und mit Ultraschall bestrahlten Allantoisflüssigkeit zunahm. Die Ursache für diese Erscheinung dürfte wahrscheinlich mit der Dispergierung der aneinanderhaftenden Virusteilchen zusammenhängen.

Berta und *Sinkovits* stellten fest, dass die natürliche Widerstandsfähigkeit von Mäusen gegenüber dem Influenzavirus durch Splenektomie und durch die Zerstörung des RES durch kolloides Kupfer herabgesetzt wird. Des weiteren stellte sich heraus, dass auch die Immunkörperproduktion des Influenzavirus durch diese doppelte Behandlung wesentlich beeinflusst wird. Nach ihrer Meinung spielt das RES in der Immunität gegenüber der Influenza eine ebenso wichtige Rolle, wie dies in Verbindung mit der antibakteriellen Immunität allbekannt ist.

Mit Rickettsia-Forschungen wurde in Ungarn während des Krieges begonnen, und das Staatliche Institut für Volksgesundheitswesen stellte denn auch mit der modifizierten *Cox*schen Methode eine bedeutende Menge von Exanthematicus-Impfstoff her. Auf diesem Gebiete bedeutete es einen neuen Abschnitt, als die Virusforschungsabteilung dieses Institutes auch das Vorkommen des Q-Fiebers in Ungarn nachwies. Das Blut von 61 unter 605 Schlachthofarbeitern gab mit Rickettsia burneti-Antigen eine Komplementbindung. Die katamnestische Untersuchung der eine positive Reaktion zeigenden Personen liess den Schluss zu, dass die Infektion vor kurzem erfolgt war. Bei Ver-

suchen mit R. burneti kommen im Laboratorium sehr häufig Infektionen vor, und obwohl im erwähnten Laboratorium mit entsprechender Umsicht gearbeitet wurde, ereigneten sich dennoch 9 Infektionen. Auf diese Weise ergab sich auch Gelegenheit, das Klinikum des Q-Fiebers in Ungarn selbst zu studieren.

Als Hauptproblem der Virusforschung in Ungarn gelten die Viruserkrankungen des menschlichen Zentralnervensystems. Seit dem Jahre 1946 wurden — hauptsächlich in Transdanubien — in immer grösserer Zahl abakterielle, sog. seröse Meningitis-Fälle beobachtet, welche manchenorts in sehr leichter Form, anderswo jedoch mit Komplikationen des Nervensystems verbunden waren. Dies wies darauf hin, dass in gewissen Fällen ausser den Gehirnhäuten auch das Nervengewebe von der Erkrankung ergriffen wird. Schon die klinischen und epidemiologischen Angaben liessen den Schluss auf eine Pluralität des Krankheitserregers zu. In der Frage der Pathogenese der Erkrankungen rief in medizinischen Kreisen auch noch der Umstand eine beträchtliche Verwirrung hervor, dass einige Ärzte bloss auf Grund des klinischen Bildes oder des histologischen Befundes pathogenetische Schlüsse zogen, obwohl darauf nur auf Grund des Nachweises des Krankheitserregers oder der Identifizierung von spezifischen Immunkörpern gefolgert werden darf. In Mittel- und Südostungarn trat die Krankheit nicht in Epidemieform auf, doch wurde auch aus diesen Gegenden eine Zahl von abakteriellen Meningitis-Fällen gemeldet, die etwas grösser war als gewöhnlich. Aus der eingehenden bakteriologischen und virologischen Untersuchung des Liquors der in die Klinik und in das allgemeine Spital von Szeged aufgenommenen 21 Kranken ging hervor, dass die Anamnese, sowie ungefähr ein Drittel der auf Grund der bakteriologischen Prüfung festgestellten serösen Gehirnhautentzündungen unbekannter Herkunft durch das Armstrongsche Virus (lymphozytäre Choriomeningitis) verursacht werden. An Hand von Umgebungsstudien, die im Zusammenhang mit einigen Fällen durchgeführt wurden, gelang es auch, als Infektionsquelle die virustragenden Mäuse festzustellen. Die aus den Krankheiten aus den Dörfern und Weilern um Szeged und aus den virustragenden Mäusen isolierten Stämme waren hinsichtlich ihrer Antigenstruktur mit den amerikanischen Stämmen identisch. Die Pathogenität der lymphozytären Choriomeningitis-Stämme, ihr Verhalten in Tierpassagen, die mit diesem Virus ausgeführten Komplementbindungsproben wurden von den Mitarbeitern des Mikrobiologischen Instituts der Medizinischen Universität Szeged bereits gleichfalls beschrieben, doch gelang es diesen Forschern nicht, die transdanubischen Fälle mit dem Armstrongschen Virus in Zusammenhang zu bringen. Das Blutserum der in den transdanubischen Ortschaften Böhönye, Bajna sowie in der Stadt Pécs Erkrankten neutralisierte nämlich im späten Rekonvaleszenzstadium nicht das Virus der lymphozytären Choriomeningitis. Diese Erkrankungen konnten auch nicht mit den ungefähr gleichzeitig in Mähren beobachteten Infektionen mit dem Meningo-encephalitis-Virus identifiziert werden. Das dort von *Gallia* isolierte Virus, das mit den rus-

sischen und schottischen Encephalitisviren in naher Verwandtschaft steht, wurde durch die Seren der transdanubischen Rekonvaleszenten ebenfalls nicht neutralisiert. All dies erweckt den Anschein, dass nur ein Teil der transdanubischen Meningitis serosa-Fälle auf das Virus zurückzuführen ist. Für diese Annahme spricht auch die Tatsache, dass es *Alföldy* und *Füzy* gelang, bei einem Teil der Meningitisfälle eine durch Leptospiren hervorgerufene Infektion nachzuweisen.

Die in der Umgebung von Szeged sporadisch vorkommende Infektion mit dem lymphozytären Choriomeningitis-Virus wurde auch anderswo angetroffen. So beobachteten in Budapest *Erdős* und neuerdings *Molnár* Infektionen mit dem Armstrongschen Virus.

Die bei leichter Poliomyelitis, bei Meningitis serosa, bei den Säuglingen bei Sommergrippe und im Bilde von epidemischer Neuralgie auftauchenden Coxsackie-Virusinfektionen — diese Virusgruppe wurde vor wenigen Jahren entdeckt — erweckten auch das Interesse der ungarischen Forscher. Im Szegeder Mikrobiologischen Institut wurden während der letzten drei Jahre mehr als 30 Stuhlproben und einige Abwasserproben zwecks Nachweises dieses Virus aufgearbeitet. Vorläufig gelang es jedoch nicht, dieses Virus zu isolieren und gleichfalls erfolglos blieben die an der Virusforschungsabteilung des Staatlichen Instituts für Volksgesundheitswesen in Budapest angestellten ähnlichen Versuche.

Mit dem Lansingschen mäusepathogenen Poliomyelitis-Virusstamm wurden in den letzten zwei Jahren im Szegeder Mikrobiologischen Institut systematische Untersuchungen durchgeführt. Laut eines ausländischen Berichtes soll Malononitril gegenüber dieses Virus eine chemotherapeutische Wirkung ausüben, doch gelang es nicht, diese Behauptung zu bestätigen. Dieses negative Ergebnis steht auch mit den Erfahrungen der ausländischen Nachprüfungen im Einklang. Es wurden von *Pintér* auch Untersuchungen in der Frage durchgeführt, inwieweit die Einwohner von Szeged und seiner Umgebung mit Poliomyelitis durchseucht waren. Zu diesem Zwecke wurden mehr als hundert Blutseren von Personen, in deren Anamnese keine Poliomyelitis vorkam, auf die Gegenwart von neutralisierenden Antikörpern geprüft. Es konnte hierbei festgestellt werden, dass dieser Virusstamm — der einen der drei bisher bekannten Typen des Poliomyelitisvirus darstellt — auch in Ungarn überaus häufig latente Infektionen verursacht. Dieses Virus wurde von 73% der von Erwachsenen genommenen Blutseren neutralisiert, während bei den Kindern das Erscheinen der neutralisierenden Immunstoffe typenmässig auf die in Verbindung mit der latenten Überstehung bekannten Verhältnisse folgt.

Über die in den letzten Jahren erzielten Ergebnisse der dezentralisierten Schutzimpfungen gegen Tollwut sowie über die gegenwärtige Herstellungsweise der Hemptschen Vakzine liegt ein Bericht von *Fornosi* und *Ujhelyi* vor. Sie gelangten nach sorgfältiger Aufarbeitung der in den Jahren 1945—49 be-

obachteten Fälle zur Feststellung, dass der Schutz gegen die menschliche Lyssa in Ungarn auch dezentralisiert gelöst werden kann und dass zu diesem Zwecke die Hemptsche Vakzine geeignet ist, obzwar eine weitere Reinigung bzw. Vervollkommnung des Impfstoffes noch wünschenswert erscheint.

An die Themen des medizinwissenschaftlichen Fünfjahrplanes der Akademie der Wissenschaften schliesst sich auch die Frage der Vermehrung der Viren, der Reproduktion des Virus an. Das Szegeder Mikrobiologische Institut stellte sich unter anderem die Klärung dieses vom theoretischen Gesichtspunkt aus überaus interessanten und bedeutungsvollen Problems zur Aufgabe und wählte hierzu als Untersuchungsgrundlage das Virus der Aujeszkyschen Krankheit. Der an der Plenarsitzung gehaltene diesbezügliche Vortrag brachte einen zusammenfassenden Bericht über den gegenwärtigen Stand dieser Frage, die sich bereits in einem Stadium befindet, das die Grundbedingungen der theoretischen Forschung gewährleistet.

An der Pécser Dermatologischen Klinik wurde der Nachweis der Viren auf Grund ihrer Fluoreszenz in Verbindung mit mehreren bekannten Viren von Professor *Melczer* untersucht. Er stellte hierbei fest, dass die mit dem Farbstoff Primulin behandelten virushaltigen Stoffe sich im ultravioletten Licht je nach den einzelnen Viren unterschiedlich verhalten. Ein Teil der Viren nimmt nämlich das Primulin auf, worauf sie dementsprechend in ultraviolettem Licht lebhaft fluoreszieren, während dieser Farbstoff von anderen Viren nicht gebunden wird. *Melczer* unterscheidet auf Grund der Primulinfluoreszenz primulinpositive und primulinnegative Viren. So färbt sich z. B. das Influenza A-Virus, während sich das B-Virus als primulinnegativ erwies. Der Verfasser selbst betont, dass die Ergebnisse von morphologischen Methoden zum Nachweis des Virus nur mit grösster Vorsicht aufgenommen werden dürfen, und deshalb würde ich es für wünschenswert halten, diese überaus interessanten Beobachtungen weiterzuentwickeln und die Untersuchungen auch auf gereinigte Virussuspensionen auszudehnen. *Melczer* fand primulinpositive Teilchen im Blasengehalt von Patienten, die an Neumannscher Aphthose erkrankt waren, und nimmt an, dass diese Gebilde die Erreger der Krankheit sind. Es gelang indessen nicht, mit dem Blaseninhalt dieser Kranken Versuchstiere oder befruchtete Eier zu infizieren. In den klinisch ähnlichen Ausscheidungen von Erythema multiforme fand er keine fluoreszierenden Elementarteilchen, weshalb er sich der Meinung jener Forscher anschloss, welche die beiden Erkrankungen als Krankheitsformen verschiedenen Ursprungs ansehen.

Es sollen hier auch noch die Arbeiten in einigen Problemen erwähnt werden, welche in den Forschungsplänen der vergangenen Jahre enthalten waren, welche aber wegen der gegenwärtigen technischen bzw. methodischen Schwierigkeiten nicht gelöst werden konnten, so dass die diesbezüglichen Forschungsarbeiten nicht den erhofften Erfolg hatten. Eine dieser Aufgaben bestand in der Untersuchung des Morbilli-Virus, die vom Szegeder Mikrobio-

logischen Institut in Angriff genommen wurde. Nach Literaturangaben vermehrt sich das Morbilli-Virus in embryonierten Hühnereiern in Form einer latenten Infektion. Da auch andere Viren die latente Infektion des Hühnereies hervorrufen können, schien es von Interesse, Versuche anzustellen, deren Ziel in der Feststellung der Infektion des Embryos bei Anwendung von feineren Untersuchungsmethoden als bisher bestand. Zum Studium dieser Frage dienten Modellversuche, bei denen versucht wurde, auf Grund der Lichtbrechung der Allantoisflüssigkeit von Hühnerembryonen, die mit Influenza-, Mumps- und Hühnerpestviren infiziert waren, auf die Gegenwart eines pathologischen Prozesses im Embryo zu folgern. Die Lichtbrechung der Allantoisflüssigkeit des infizierten Embryos verändert sich tatsächlich, was eine Folge der Schädigung des Hühnerembryos ist. Leider verursacht aber eine geringfügige, leichte Veränderung der Embryonengewebe keine Veränderung der Lichtbrechung der Allantoisflüssigkeit, weshalb denn auch diese Methode zum Nachweis von latenten Virusinfektionen, wie z. B. zur Untersuchung des Morbilli-Virus, nicht geeignet ist.

Gleichfalls erfolglos blieben die Versuche, die an der Virusforschungsabteilung des Staatlichen Instituts für Volksgesundheitswesen zur Untersuchung des Hepatitisvirus vorgenommen wurden.

Vor einer kurzen Schilderung der veterinärmedizinischen und landwirtschaftlichen Virusforschungen soll eine Auswertung der im humanmedizinischen Sektor erzielten Ergebnisse versucht werden. Dies ist keineswegs eine leichte Aufgabe, die nur dann wirklich wertvoll sein wird, wenn sie mit einer entsprechenden Kritik verbunden ist. Es kann festgestellt werden, dass in Ungarn seit der Befreiung sowohl auf dem Gebiete der humanmedizinären wie auch auf dem der theoretischen Virusforschung ein allmählicher und ständiger Fortschritt zu verzeichnen ist. Dieser ist am ausgeprägtesten in der Virusforschungsabteilung des Staatlichen Instituts für Volksgesundheitswesen in Budapest. Zweifellos war dieses Institut vom Gesichtspunkt des Vorhandenseins der entsprechenden Arbeitskräfte schon am Anfang in der günstigsten Lage, doch konnte es daneben auch die Ausbildung einer grossen Zahl von neuen Fachleuten sicherstellen. Die Universitätsinstitute befinden sich in dieser Hinsicht bereits in einer ungünstigeren Situation; die im Budapester Mikrobiologischen Institut in Angriff genommenen Virusarbeiten wurden vorübergehend eingestellt und im Szegeder Mikrobiologischen Institut entwickelten sich die Forschungsarbeiten — obwohl die Ausbildung und der Einsatz von neuen Forschern plangemäss erfolgte — nicht in jenem Tempo, wie man es im ersten Zeitabschnitt erwarten durfte. In den Universitätsinstituten verursacht der Wechsel des Personals leider Schwierigkeiten, wozu noch der Umstand kommt, dass die Lehrstühle neben ihren vielseitigen Aufgaben die Schaffung wunschgemässer ungestörter Verhältnisse für die Virusforschung nicht restlos zu gewährleisten imstande sind.

Es kann weiters festgestellt werden, dass sich die Virusforschungsarbeiten gut an die Wissenschaftspläne unseres Fünfjahrplanes anschlossen und dass die Arbeiten plangemäss vor sich gingen. Es wäre jedoch wünschenswert, wenn die Institute neben der Weiterentwicklung der sich ausgebildeten Schwerpunktsfragen sich auch an die Lösung neuer Aufgaben heranwagen wollten, was aber nur im Falle der Sicherstellung einer grösseren Anzahl von wissenschaftlichen und technischen Hilfskräfte als bisher möglich sein wird.

Die Ergebnisse und Zielsetzungen der veterinärmedizinischen Virusforschung können wie folgt zusammengefasst werden. Hier handelt es sich in erster Linie um Studien, deren Ziel die Lösung praktischer Probleme war. Zahlreiche Autoren befassten sich mit besonderer Sorgfalt mit der näheren Erforschung der Eigenschaften des Hühnerpestvirus und mit der Ausarbeitung eines wirkungsvollen Immunisationsverfahrens gegen diese Krankheit. Auf dem Gebiete der Schweinepest bedurfte die Möglichkeit einer eventuellen Pluralität des Virus sowie auch die Rolle der immunbiologischen Reaktionsfähigkeit des Organismus in der Ausbildung der Krankheit einer Klarstellung. Es gelang eine Vakzine gegen Schafpocken auszuarbeiten, die das Virus dieser Krankheit in inaktivierter Form enthält und infolgedessen im Gegensatz zu den auf der ganzen Welt verwendeten Impfstoffen ungefährlich ist. Diese Vakzine hat sich auch in der Praxis bewährt. Es wurden auch Untersuchungen zur gründlicheren Erforschung jener Viren durchgeführt, die an Schafen und Ziegen eine infektiöse blasenbildende Hautentzündung hervorrufen, sowie zur Entdeckung eines Verfahrens, das dieses Virus für eine aktive Immunisation geeignet macht. Auch das fixe Virus der Tollwut sowie das Virus der infektiösen Schweinelähmung bildeten den Gegenstand von eingehenden Untersuchungen. Endgültig konnte die Identität des Erregers des bei Pferden vorkommenden Abortus mit dem katarrhalen Pferdestaupevirus sowie die Rolle des Virus der unter dem Namen epidemisches Husten der Pferde bekannten Krankheit in der Ätiologie der Drüsenkrankheiten geklärt werden. Schliesslich wurde darauf hingewiesen, dass in der Pathogenese der infektiösen Lungen- und Darmentzündung der Kälber Viren eine gewisse Rolle spielen.

Seit der Befreiung konnten auch auf dem Gebiete der pflanzlichen Virusforschung bedeutende Fortschritte erzielt werden. Im Forschungsinstitut für Pflanzenschutz in Budapest wurde ein Virusforschungslaboratorium eingerichtet. Die hier durchgeführten Arbeiten befassen sich einesteils mit virenbiologischen Forschungen und anderenteils mit praktischen Problemen des Pflanzenschutzes.

Es wurde von *Szirmai* eine serologische Diagnostik für Pflanzenviren in Anpassung an die ungarischen Verhältnisse ausgearbeitet, so dass jetzt zur Identifizierung des die Kartoffeln am meisten schädigenden Virus, des X-Virus, eine leichte und gute praktische Methode zur Verfügung steht. *Szirmai* konnte auch bei der Untersuchung der Verbreitung der Viruskrankheiten mit dem Saatgut feststellen, dass an einigen endemischen Orten das infizierte Saatgut

bei mehreren Kulturpflanzen die Vermittlerrolle spielt. *Szirmai*, *Husz* und *Klement* entdeckten bisher in Ungarn unbekannte Viruskrankheiten der Obstbäume und verfolgten ihre Verbreitungsweise auf experimentellem Wege. Es wurden auch mehrere in Ungarn bisher unbekannte Viruskrankheiten beobachtet und ihr Vorkommen mit Infektionsversuchen an anderen Pflanzen, wie Industrie-, Heil- und Zierpflanzen identifiziert. Mit der Frage der virösen Erkrankungen und der Immunität des Tabaks befasste sich ausführlich Professor *Gulyás*, wobei er auch die chemotherapeutischen Probleme der Viruskrankheiten studierte.

Die vorstehende Zusammenfassung dürfte ein gutes Bild über die schwungvolle Entwicklung vermittelt haben, welche die ungarische Virusforschung seit der Befreiung durchgemacht hat. Diese Entwicklung ist das Ergebnis einer planmässigen Arbeit und hängt eng mit dem Wiederaufbau unseres wirtschaftlichen sowie wissenschaftlichen Lebens zusammen.

BERICHT ÜBER DIE ERGEBNISSE DER PARASITOLOGISCHEN FORSCHUNGSARBEIT IN UNGARN IN DEN JAHREN 1945—1951

S. KOTLÁN,

Institut für Parasitologie der Veterinärhochschule in Budapest

Wenn wir über die Arbeit Rechenschaft ablegen, die auf dem Gebiet der Parasitologie sowohl in speziell medizinischer als auch in rein zoologischer Hinsicht in der etwa siebenjährigen Zeitspanne seit der Befreiung geleistet wurde, müssen wir feststellen, dass sich der Aufschwung von dem Tiefpunkt, auf den diese Wirksamkeit in den Kriegsjahren gesunken war, recht langsam vollzog. Jahre vergingen, bis die parasitologische Forschungsarbeit erneut in Angriff genommen werden oder die Ergebnisse der in früheren Jahren durchgeführten Arbeiten zur Veröffentlichung gelangen konnten. Erst die Unterstützung durch den Senat für Wissenschaft bzw. durch die Ungarische Akademie der Wissenschaften im Rahmen des Drei- und Fünfjahrplans ermöglichte auch auf dem Gebiet der Parasitologie eine Forschungstätigkeit, die, hauptsächlich auf veterinärmedizinischem Gebiet, zur Häufigkeit der parasitären Erkrankungen und zur Schwere der durch diese verursachten volkswirtschaftlichen Schäden im rechten Verhältnis steht.

Die Gruppierung der in den erwähnten 7 Jahren erschienenen parasitologischen Arbeiten dürfte am zweckmässigsten nach den systematischen Hauptgruppen erfolgen, in welche die behandelten Parasiten gehören.

Protozoa. Die mit dem zweiten Weltkrieg zusammenhängenden Tierbewegungen brachten es mit sich, dass die unter dem Namen Dourine bekannte Form der Pferde-Trypanosomatose auch in Ungarn in grossem Umfange zur Verbreitung gelangte ; mit dieser Krankheit befassten sich teils vom diagnostischen, teils vom therapeutischen Gesichtspunkt mehrere Forscher. *L. Vizy* (1947) vergleicht in seiner Arbeit »Die Serodiagnostik der Beschälkrankheit« die Brauchbarkeit der serologischen Proben, die zum Nachweis der Krankheit in Anspruch genommen werden können, und stellt fest, dass während die Agglutinationsprobe aus wirtschaftlichen Gründen und die Konglutinationsprobe infolge der Langwierigkeit und der geringeren Empfindlichkeit des Verfahrens für Massenuntersuchungen ungeeignet sind, die Komplementbindungsreaktion in der von ihm angegebenen Modifikation zuverlässige Ergebnisse gewährleistet und dreiwöchentlich zweimal wiederholt, ein geeignetes Verfahren zur serologischen Feststellung der Ansteckung mit Trypanosomen darstellt. Die

Modifikation besteht im wesentlichen darin, dass die Antigenmenge bei der Untersuchung jedes einzelnen Serums genau titriert wird. *J. Csek* (1947) und *L. Hagara* (1947) beschäftigen sich in ihren Arbeiten mit den Toxizitätsunterschieden der zur Therapie der Beschälkrankheit benutzten beiden Arsenobenzolpräparate Revival und Neosalvarsan; während nach *Csek* eine nennenswerte toxische Wirkung von Revival nur bei Anwendung grösserer Dosen zu befürchten ist, hält *Hagara* auf Grund seiner Erfahrungen die Toxizität von Revival im allgemeinen für bedeutender als die des Neosalvarsans. *Gy. Balázs* (1949) berichtet über Erfahrungen mit der Mapharsen-Behandlung.

Mit den pathogenetischen und therapeutischen Beziehungen der Tauben-Trichomonadose befasst sich *K. Bamberger* (1948). Als prophylaktische Massregel empfiehlt er die Verabreichung von 0,8% konzentrierte Salzsäure enthaltendem Trinkwasser an erwachsene Tauben, zur Lokalbehandlung der erkrankten jungen Tauben hingegen die Benutzung einer Salzsäurelösung von ähnlicher Konzentration.

Mit der Züchtung von Trichomonas foetus sowie der serologischen Diagnose der Rinder-Trichomonadose beschäftigt sich in zwei Arbeiten *A. Bartha* (beide 1951). In der ersten weist er darauf hin, dass sich die Trichomonaden in einer auf 7,6—7,8 pH eingestellten Serumbouillon reichlich kultivieren lassen. Reinkulturen können mit Hilfe von Antibiotika hergestellt werden. Mit Bezug auf Lebensdauer und Vermehrungsbereitschaft der Trichomonaden stellt der Autor fest, dass proportional zum Mass der Vermehrung auch die Menge der Stoffwechselprodukte der Trichomonaden zunimmt und dass dieser Umstand zur Säuerung des Nährbodens und folglich zum vorzeitigen Absterben der Trichomonaden führt. Die Anwendung eines $CaCO_3$-Puffers ermöglicht es, dass die Trichomonaden eines Nährbodens bis zu dessen Erschöpfung — durchschnittlich 3 Wochen — am Leben bleiben bzw. sich vermehren. Schliesslich weist der Verfasser darauf hin, dass Trichomonaden sich auch in Anwesenheit von Sauerstoff gut züchten lassen, wenn die Atmosphäre des Nährbodens eine genügende Menge (12,5—50%) Kohlensäure enthält.

In seiner zweiten Arbeit weist der Verfasser nach, dass das von *Florent* sowie *Zavagli* und *Sanfile* vorgeschlagene Komplementbindungsverfahren zum Nachweis der Trichomonas-Infektion ungeeignet sei, da die auf diese Weise gewonnenen Bindungen nicht als spezifisch betrachtet werden können, sondern zweifellos mit dem Eiweissgehalt der Blutsera, namentlich mit dem Verhältnis des Albumin-Globulin-Gehaltes, in Zusammenhang stehen.

Besondere Aufmerksamkeit wird seitens der Veterinärforscher dem Studium der Kokzidiose gewidmet, was wohl zum Teil auf das häufige Vorkommen dieser Krankheit bei Wiederkäuern, Kaninchen und Geflügel und die damit verbundenen namhaften Verluste zurückzuführen ist. Letztere Umstände, nicht minder auch die Unzulänglichkeit unserer Kenntnisse über Entwicklung und Pathoaenität so mancher, in Haustieren schmarotzender Kokzidienarten, brachten

es mit sich, dass die Kokzidiose in die Reihe der im Vordergrund stehenden Forschungsprobleme gestellt wurde. Eine Anzahl von Veröffentlichungen befasste sich mit der Therapie der Kokzidienruhr der Rinder mittels Neotodorit, einem Wismutpräparat. Laut der Berichte [*Fridrichovszky* und *Pellérdy* (1948 und 1948), *Zsigmond* (1948)] ergab die Neotodorit-Behandlung in akuten Fällen auffallend günstige Resultate. Da indessen nach den Untersuchungen *Pellérdys* (1949) Neotodorit keine coccidiostatische Wirkung besitzt, prüfte *Lami* (1951), um für die günstige therapeutische Wirkung des Präparats eine Erklärung zu finden, den Einfluss von Neotodorit auf Blutung und Blutgerinnung. Diese Versuche haben die Wirkung von Neotodorit auf die Verkürzung der Blutungsdauer sowie die Beschleunigung der Gerinnungszeit unzweifelhaft erwiesen, womit es scheinbar gelang, den Einfluss des Präparats auf den coccidiogenen Prozess zu erklären. Nachdem indessen neuerdings *Kotlán* (akademischer Vortrag, 1951) darauf hinwies, dass die an Rindern beobachteten kurzdauernden und zweifellos coccidiogenen Darmblutungsprozesse sehr häufig auch spontan aufhören, ist es in Ermanglung einer coccidiostatischen Wirkung von Neotodorit fraglich geworden, ob das in diesen Fällen in der Praxis angewandte Präparat auf den Verlauf des coccidiogenen Prozesses irgend einen Einfluss ausübte. In dem erwähnten Vortrag deutet *Kotlán* auf die Möglichkeit hin, dass die Ursache für die Entstehung der kurzdauernden Darmblutungsprozesse bei Rindern möglicherweise auf das Ausschwärmen einer Riesenzahl von Merozoiten aus grossen Schizonten (Globidien) und auf ihre Ansiedlung in der Schleimhaut des Dickdarms bzw. auf das Ingangsetzen der gametogonischen Prozesse zurückzuführen sei. Mit dem Aufhören der letzteren kommen naturgemäss auch die hämorrhagischen Erscheinungen zum Stillstand, und zwar ohne Rücksicht darauf, ob die hämostatische bzw. gerinnungsfördernde Wirkung des Neotodorits zur Geltung gelangt oder nicht.

Kotlán und *Pellérdy* (1949) gaben eine Übersicht über den Status der in Kaninchen schmarotzenden Eimeria-Arten und einen Schlüssel zur Bestimmung der als gültig anerkannten Spezies. *Pellérdy* (1949) hat in einer Arbeit über die Eimeria-Arten der einheimischen Schweine, auf Grund experimenteller Untersuchungen darauf hingewiesen, dass von Eimeria scabra eine ihr ziemlich ähnliche Art abzugrenzen sei. *Kotlán* (1951) bespricht die Homonymie von Eimeria piriformis und stellt unter Berücksichtigung der Priorität fest, welche Eimeria-Art diesen Namen zu tragen berechtigt ist. *Kotlán*, *Pellérdy* und *Versényi* (1951) befassen sich in ihrer Arbeit zum erstenmal mit der Globidien-Frage der Schafe und weisen darauf hin, dass Globidien in Schafen zu den alltäglichen Befunden gehören. Mit Rücksicht auf die morphologischen Unterschiede, die zwischen den Merozoiten mancher Schizonten bestehen, wird angenommen, dass beim Schaf grosse Schizonten (Globidien) zu mehr als einer Emeria-Art gehören.

In einer folgenden Arbeit (*Kotlán*, *Pellérdy* und *Versényi*, 1951) wird der experimentelle Nachweis dafür erbracht, dass unter den beim Schaf vorkommen-

den Eimeria-Arten es E. parva ist, die im endogenen Zyklus Globidien aufweist. Ferner wird darauf hingewiesen, dass ähnlich wie bei Eimeria bovis des Rindes, bei der Schizogonie der E. parva ebenfalls nur eine Generation grosser Schizonten vorkommt. Diese Schizonten sind zumeist von ovaler Form, besitzen einen Durchmesser von 256×128 μ, die Länge ihrer Merozoiten beträgt in Schnitten etwa 6—8 μ. Die gametogonischen Prozesse gehen grösstenteils in den Dickdärmen vor sich. In derselben Arbeit geben Verfasser der Ansicht Ausdruck, dass unter den Eimeria-Arten der Schafe es E. intricata ist, in deren endogenen Zyklus gleichfalls ein Globidium-Stadium vorkommt. Sie halten es für wahrscheinlich, dass die in den grossen Schizonten dieser Art entstehenden Merozoiten sich wohl auf Grund ihrer morphologischen Eigenheiten von den Merozoiten der E. parva werden abgrenzen lassen.

Eingehende Versuche wurden über die Sulfonamidtherapie der Kokzidiose durchgeführt. *Pellérdy* (1949) wies nach, dass sich die tenella-Kokzidiose der Kücken mit dem ungarischen Präparat Ultraseptyl ebenso erfolgreich bekämpfen lässt wie mit dem erheblich teureren ausländischen Sulfonamidpräparaten. Im Gegensatz zur Ansicht ausländischer Autoren erbringen *Pellérdy* und *Temesi* (1951) den experimentellen Beweis auch dafür, dass Ultraseptyl auch bei der Leberkokzidiose der Kaninchen mit Erfolg verwendet werden kann.

Trematoda. Die Bekämpfung der hauptsächlich in Transdanubien ernsthafte wirtschaftliche Schäden verursachenden Leberegelkrankheit ist ebenfalls ein wichtiges Problem des veterinärmedizinischen Forschungsplans. Die auf diesem Gebiet eingeleitete Arbeit ist rein praktischer Art und verfolgt den Zweck, die latenten Egelinfektionen in den Rinderbeständen des staatlichen Sektors in Transdanubien festzustellen und durch deren planmässige therapeutische Behandlung die Prävention in möglichst weiten Kreisen zu vertiefen. Die Ausbreitung der Egelinfektion in den Rinder- und Schafbeständen Transdanubiens veranschaulichen auf Grund der Reihenuntersuchungen des Jahres 1950 die Angaben von *Pellérdy* und *Bartel* (1950); über die Erfolge der in diesem Teil des Landes in Angriff genommene Sanierung während des ersten Jahres berichtet *Pellérdy* (1951).

Cestoda. Mit den Parasiten dieser Gruppe befassten sich nur wenige Arbeiten. *Kotlán* (1947) publizierte eine Abhandlung über das Ergebnis der im Parasitologischen Institut durchgeführten Untersuchungen über die Anreicherungsmöglichkeit der Bandwurmeier und hebt hervor, dass Kalium carbonicum in einer Lösung von entsprechender Konzentration zur Anreicherung nicht nur der Eier der Taenia-Arten, sondern auch der Dipylidium-Eikapseln gut geeignet sei. *J. Boray* (1951) weist in einer Arbeit darauf hin, dass Atebrin bei der Bekämpfung der Bandwürmer von Fleischfressern von guter Wirkung sei.

Nematoda. Die Untersuchungen über Nematoden bewegen sich teils in entwicklungsgeschichtlicher, teils in therapeutischer Richtung. *Kotlán* (1948) klärt auf Grund experimenteller Untersuchungen den Entwicklungsgang der

im Schwein schmarotzenden Oesophagostomum-Arten und stellt im Gegensatz zu den Angaben ausländischer Autoren fest, dass die histotrope Phase dieser Arten 6 Tage währt, innerhalb welcher Zeit die Larven des 3. Stadiums die 3. Häutung vollführen, während die 4. Häutung nach ihrer Rückkehr ins Darmlumen frühestens am 10., am häufigsten jedoch zwischen dem 20. und 30. Tage nach der Infektion stattfindet. Die ♀♀ erreichen ihre Geschlechtsreife frühestens am 49. Tage nach der Infektion. In einer andern Arbeit befasst sich *Kotlán* (1949) mit der histotropen Phase von Hyostrongylus rubidus-Larven und stellt fest, dass die histotrope Phase im Entwicklungszyklus dieser Art in zweierlei Formen auftreten kann. Die regelmässige Phase dauert rund zwei Wochen und hängt mit zwei Häutungen zusammen. Bei der unregelmässigen Phase halten sich die Larven auch nach Beendigung der 3., gegebenenfalls auch der 4. Häutung noch längere Zeit im Drüsenlumen der Magenschleimhaut auf, was zur Entstehung augenfälliger Herde führt. In einem Kongressreferat beschäftigt sich *Kotlán* (1949) mit der im Entwicklungszyklus einiger Fadenwurmarten vorkommenden histotropen Phase einerseits vom Gesichtspunkt ihrer entwicklungsgeschichtlichen, anderseits ihrer pathodiagnostischen Bedeutung.

Über das Problem der Therapie der Ascaridosis wurden mehrere Abhandlungen veröffentlicht. *Csörsz* (1949) berichtet über die erfolgreiche Behandlung der Pferdeascaridose mit dem neuen Präparat Biascarin, *J. Kovács* (1950) sowie *J. Hegedüs* (1950) behandeln die Therapie der Schweineascaridose mit Fluoriden und geben sowohl die unter experimentellen Bedingungen wie in der Praxis erzielten Ergebnisse bekannt. Die bisherigen Erfahrungen beziehen sich vorläufig auf Natriumfluorid und lassen sich dahingehend zusammenfassen, dass sich die Ascaridose durch Verabreichung einer bestimmten Menge dieses Mittels im Futter erfolgreich bekämpfen lässt.

Ein interessantes Problem wirft *Gy. Papp* (1951) in Verbindung mit der Ätiologie der periodischen Augenentzündung von Pferden durch die Feststellung auf, dass in jenen Gegenden Ungarns, wo die Mondblindheit am häufigsten auftritt, die Pferde sich in auffallend hoher Prozentzahl als Träger von Mikrofilarien erweisen. Er stellt daher die Frage, ob die Anwesenheit der Mikrofilarien im Kreislaufsystem nicht etwa mit der Entwicklung der periodischen Augenentzündung in ätiologischen Zusammenhang gebracht werden könne. Obgleich unsere Kenntnisse über die Pathogenität der im Blut kreisenden Mikrofilarien zu einer positiven Stellungnahme in dieser Frage kaum einen Stützpunkt bieten, steht doch ausser Frage, dass die Durchführung eingehender Untersuchungen im Interesse der Klärung dieses Problems zweckmässig erscheint.

Endlich befasst sich *Kotlán* (1951) in einer Arbeit (Acta Vet. I, Heft 1) an Hand neuer Beobachtungen mit den seit 1880 in Ungarn bekannt gewordenen Fällen von humaner Filariidose. Er berichtet über insgesamt 9 Fälle, von denen in 5, hierbei auch den neuen eingerechnet, ein Wurmexemplar im subkutanen

Bindegewebe (4 Fälle) bzw. im Ligamentum gastrosplenicum (1 Fall) eine Bindegewebswucherung verursachte ; der Wurm entspricht aller Wahrscheinlichkeit nach der von *Addario* beschriebenen »Filaria conjunctivae«, die nach unseren neuesten Kenntnissen mit Dirofilaria repens identisch ist.

Arthropoda. Die grosse Verbreitung der Schafräude sowie der Dasselkrankheit beim Rind gab Anlass zu eingehenden Untersuchungen in therapeutischer Hinsicht. *J. Mócsy* (1946) hat in seiner Arbeit über die Kontaktgifte als erster daran gedacht, diese, neben ihrer äusserlichen Anwendung, im Kampf gegen Ektoparasiten auch peroral zu verabreichen. *Mócsy* (1946, 1948) stellt diesbezüglich fest, dass insbesondere im Interesse einer Heilung der Scabies und Demodicosis in Fällen, in denen andere therapeutische Verfahren aus verschiedenen Gründen nicht in Anspruch genommen werden können, auch die perorale Anwendung in Frage kommen kann. Auf jeden Fall muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass die Spanne zwischen der wirksamen und der toxischen Dosis ziemlich gering ist, so dass Vergiftungen hauptsächlich deshalb leicht vorkommen können, weil die Kumulation der Kontaktgifte, infolge ihrer langsamen Ausscheidung, verhältnismässig rasch eintreten kann. Massnahmen für die Bekämpfung der Hypodermatose behandelt *Mócsy* (1951) in mehreren Arbeiten. Er stellt fest, dass gegenwärtig kein auch in der Praxis anwendbares Verfahren bekannt sei, mit dessen Hilfe es möglich wäre, die eierlegenden Fliegen von den Tieren erfolgreich fernzuhalten. In Eigenversuchen gelang es ihm nicht, die im Wirtkörper wandernden Hypodermalarven durch peroral verabreichtes Kontaktgift zu töten. Daher kann unter den heutigen Verhältnissen lediglich von der Vernichtung der in der Haut bzw. im subkutanen Bindegewebe angesiedelten Larven die Rede sein. Ernsthafte Schwierigkeiten verursacht auch auf diesem Gebiet der Umstand, dass die Entwicklung der Larven ungleichmässig vor sich geht, so dass die Wahl des Zeitpunktes für die Larvenvernichtung sowie die Bestimmung der Anzahl der Behandlungen eine schwierige Aufgabe darstellen. Laut *Mócsy* sind auch im günstigsten Fall 3 Behandlungen in sechswöchigen Abständen nötig. Als Vernichtungsverfahren empfiehlt er lediglich die Salben- und Injektionsmethode, als Heilmittel stehen jedoch verschiedene Stoffe zur Verfügung.

Vom Gesichtspunkt des öffentlichen Gesundheitswesens verdient die Wirksamkeit von *A. Soós* und *T. Mihályi* bei der Vorbereitung des Kampfes gegen die malariaverbreitenden Mücken in Ungarn besondere Beachtung. Die seit Jahren durchgeführten Untersuchungen zur Bestimmung der malariaverbreitenden Mückenarten sowie zur Ausarbeitung der Tilgungsverfahren, haben bereits recht bedeutsame Ergebnisse gezeitigt.

Eine Erweiterung unserer acarologischen Literatur stellen die Untersuchungen von *T. Kobulej* (1951) über parasitische Trombidiiden-Larven dar, als deren Ergebnis der Autor eine neue Art (Trichotrombidium muscae n. g. et sp. n.) beschrieb.

Pentastomida. Über die Verbreitung und Häufigkeit von Zungenwürmern in Haustieren sowohl im Larvenzustand wie in entwickelter Form berichten *F. Holló* (1950) und *P. Kapp* (1950). Während *Holló* bei 30% der Rinder Linguatulalarven fand, konnte *Kapp* bei ungarischen Hunden und Füchsen nur in den ersteren und lediglich bei 5,24% der untersuchten Tiere entwickelte Formen feststellen. Die Disproportion in der Verbreitung der Larven und der entwickelten Form ist nach *Kapp* darauf zurückzuführen, dass Linguatula rhinaria allem Anschein nach nur in solchen Hunden vorkommt, deren Infektion durch spezielle Umstände gefördert wurde.

AKTUELLE EPIDEMIOLOGISCHE FRAGEN IN UNGARN

A. PETRILLA

Staatliches Institut für Volksgesundheitswesen, Budapest

In der jetzt beginnenden Vortragsreihe des Kongresses der Ungarischen Mikrobiologischen Gesellschaft befassen sich viele Vorträge mit den Problemen der Infektionskrankheiten des Menschen. Die Vortragenden berichten über die Ergebnisse ihrer Forschungen, diese beschränken sich jedoch bloss auf Einzelheiten. Aus diesem Grunde dürfte es vielleicht nicht ohne Interesse sein, vom Gesichtspunkte des Epidemiologen einen kurzen Überblick über jene Infektionskrankheiten zu geben, welche die für die Bekämpfung der Infektionskrankheiten verantwortliche Fachleute in der nahen Vergangenheit oder auch gegenwärtig vor besondere Aufgaben stellten.

Der zweite Weltkrieg brachte Ungarn in Hinsicht der Infektionskrankheiten in eine schwere Lage, diese Schwierigkeiten wurden jedoch rasch überwunden. Es wurden nicht nur die typischen Kriegskrankheiten erfolgreich bekämpft, sondern auch positive Ergebnisse gegenüber Krankheiten erzielt, welche zwar keine typischen Kriegskrankheiten sind, aber infolge des Krieges in grösserer Zahl vorkamen.

Von den typischen Kriegskrankheiten sei zuerst das Fleckfieber erwähnt. Diese Krankheit kam vor dem Kriege nur in Form kleinerer Epidemien vor, — hauptsächlich bei den in Kolonien zusammengedrängten Zigeunern —, infolge der Kriegsereignisse stieg jedoch die Zahl der Erkrankungen stark an. Im Jahre 1945 kamen in der Zivilbevölkerung mehr als 3500 Erkrankungen vor, doch gelangten die grosszügigen präventiven Massnahmen der Regierung zur Bekämpfung des Fleckfiebers bald zur Geltung. Als Ergebnis der Verbesserung der allgemeinen hygienischen Lage und der Anwendung der DDT enthaltenden Pulver kamen 1948 hundertmal weniger Erkrankungen vor, als im Jahre 1945. Im Jahre 1950 konnten dann im ganzen Lande bloss noch 4 sporadische Fälle beobachtet werden. Es handelte sich hier jedoch lediglich um Fälle, bei denen die Diagnose des Fleckfiebers nur auf Grund der Blutuntersuchung festzustellen war. Ohne Blutuntersuchung wären diese Fälle wahrscheinlich kaum erkannt worden. Infolge der in Ungarn obligatorischen Laboratoriumsuntersuchungen ist es nicht wahrscheinlich, dass die Ärzte eine Fleckfiebererkrankung nicht erkennen würden. Es besteht nämlich die Vorschrift, dass auch bei Ver-

dacht von Abdominaltyphus Blut zur Untersuchung einzusenden ist. Das Laboratorium untersucht dann das Blut nicht nur auf Abdominaltyphus, sondern gleichzeitig auch auf Fleckfieber. Auf diese Weise gelang es öfter aus dem Blut des auf Abdominaltyphus verdächtigen Kranken Fleckfieber zu diagnostizieren. Eine weitere, auf Klärung wartende Frage ist inwieweit diese sporadischen Fälle als Rezidiven oder als andere Rickettsiosen zu betrachten sind (*Brill*sche Krankheit).

Zur Prävention kann ausser der Anwendung der Entlausungsmittel auch die Vakzination gegen Fleckfieber in Frage kommen. In Ungarn wird gegenwärtig die nach dem *Cox*schen Verfahren erzeugte Eiervakzine angewendet; damit werden ausser dem Sanitätspersonal die der Infektion am meisten ausgesetzten Personen geimpft.

Die andere typische Kriegskrankheit ist das Rückfallfieber. Diese Krankheit verursachte in Ungarn während des ersten Weltkrieges einige Erkrankungen und dann tauchte sie erst nach dem zweiten Weltkriege wieder auf. In den Jahren 1946 und 1947 wurde eine mehrere hunderte Fälle aufweisende Epidemie beobachtet. Ausgebreitete Anwendung der Entlausungen, das Aufspüren und die sofortige Behandlung der Kranken ermöglichte es diese Krankheit gänzlich zu liquidieren, so dass 1949 keine einzige Erkrankung mehr vorkam.

Aus der Gruppe der enteralen Infektionskrankheiten muss der Abdominaltyphus hervorgehoben werden. Diese Krankheit forderte früher zahlreiche Opfer, und Ungarn gehörte zu den mit Typhus am meisten verseuchten Ländern Europas. Über die Zahl der Erkrankungen liegen erst seit 1931 verlässliche Angaben vor. Diese besagen, dass in dieser Zeit im ganzen Lande sehr viele Erkrankungen zu verzeichnen waren (Abb. 1). Besonders erwähnenswert ist die Epidemie des Jahres 1932, als die Welle der sommerlichen Endemie eine besondere Höhe erreichte. Das Staatliche Institut für Volksgesundheitswesen begann eine ausgedehnte Arbeit zur Liquidierung der Typhuserkrankungen. Schon 1930 wurden die Laboratoriumsuntersuchungen obligatorisch angeordnet. Ausser der Sicherung der Diagnose durch Laboratoriumsuntersuchungen, wurde das Aufheben der Absonderung des Kranken nach der Genesung auch an 2 negative Laboratoriumsbefunde gebunden. Es wurden ausgebreitete Bazillenträger-Untersuchungen begonnen, welche sich auf die Umgebung der Kranken und auf die sich mit Lebensmitteln beschäftigenden Personen erstreckten. Als Ergebnis der Untersuchungen hält das Staatliche Institut für Volgesundheitswesen heute rund 1500 chronische Bazillenträger in Evide z. Eine der besten präventiven Waffen gegen den Typhus ist die Schutzimpfung. Solange man aber zur Impfung die *Kolle*-Vakzine anwandte, also dreimal geimpft werden musste, konnten die Impfungen praktisch schwer durchgeführt werden. *Lovrekovich* und *Rauss* arbeiteten im Hygienischen Institut einen präzipitierten Impfstoff aus, mit

dem eine einzige Impfung genügt. Über ihre damit erzielten Ergebnisse berichteten diese Autoren im Jahre 1940. Später bewies *Rauss*, dass der von Ihnen ausgearbeitete Impfstoff wenigstens so wirksam ist wie die *Kolle*-Vakzine, mit welcher man aber dreimal impfen muss. Für die Praxis stellt die einmalige Impfung einen gewaltigen Vorteil dar. Die Schutzimpfungen wurden nach der Befreiung auf breite Bevölkerungsschichten ausgedehnt und zur Zeit werden jährlich cca. 1 million Menschen gegen Typhus geimpft. Ein Teil der geimpften Personen wird von der Umgebung der Kranken gebildet, während der grössere Teil der Schutzimpfungen in jedem Frühjahr an der Bevölkerung jener Gegenden vorgenommen wird, wo im vergangenen Jahre die Zahl der Erkrankungen den Durchschnitt übertraf. Durch dieses Verfahren wird erreicht, dass mit

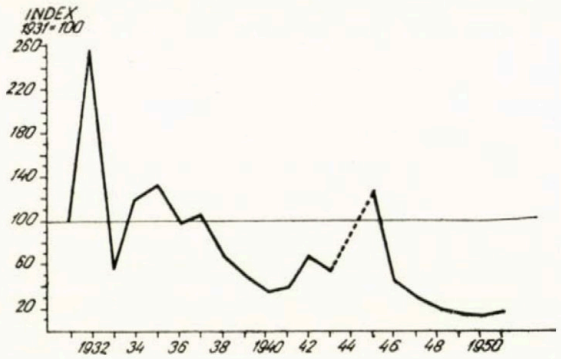


Abb. 1. Typhuserkrankungen in Ungarn

der Zeit die ganze Bevölkerung des Landes nicht nur einmal, sondern öfters gegen Typhus geimpft wird.

Die bei der Bekämpfung des Typhus erzielten Ergebnisse lassen sich nicht nur auf die Aufspürung der Bazillenträger und auf die Schutzimpfungen zurückführen sondern auf alle Faktoren, welche in den letzten Jahren zur Verbesserung des Gesundheitswesens führten. Die bessere ärztliche Versorgung, die Ausbreitung der sozialen Versicherung auf einen immer grösseren Teil der Bevölkerung, die bessere Hospitalisierung der Kranken, die bessere Krankenversorgung, das allgemeine Ansteigen der hygienischen Kultur, die Liquidierung der Rückständigkeit des Dorfes tragen dazu bei, dass heute jährlich ungefähr 10 000 Personen weniger an Typhus erkranken und ungefähr 1500 weniger an Typhus sterben als am Anfang der dreissiger Jahre. Wenn man in Betracht nimmt, dass ein Typhuskranker auf cca. 2 Monate aus der Produktion ausfällt dann darf man füglich behaupten, dass die bei der Bekämpfung des Typhus erzielten Ergebnisse auch für die Volkswirtschaft von Bedeutung sind.

Die bei der Bekämpfung des Typhus erreichten guten Ergebnisse bedeuten aber keinesfalls, dass diese Arbeit als abgeschlossen zu betrachten ist. Die bisher herangezogene Mittel sollen auch weiterhin angewendet und durch die neueren

Ergebnisse der epidemiologischen Forschung ergänzt werden. In den letzten Jahren führte *Eörsi* die Phagtypisierung der Typhusbazillen ein, mit dieser Methode konnten dann bei der epidemiologischen Arbeit gute Resultate erzielt werden. Bei der Ermittlung der Bazillenträgern wurde gleichfalls von *Eörsi* die Vi Agglutination eingeführt, wodurch das Aufspüren und Unschädlichmachen einer immer grösseren Zahl von Bazillenträgern ermöglicht wurde.

Es ist zu erwähnen, dass auch die Letalität des Typhus erfreulich abgenommen hat. Am Anfang der dreissiger Jahre betrug die Letalität 12%, wogegen sie heute um 7% schwankt. In diesen Ergebnissen spielen einesteils die besseren therapeutischen Verfahren und anderenteils auch jener Umstand eine Rolle, dass mit der Ausbreitung der Schutzimpfung auf einen grossen Teil der Bevölke-

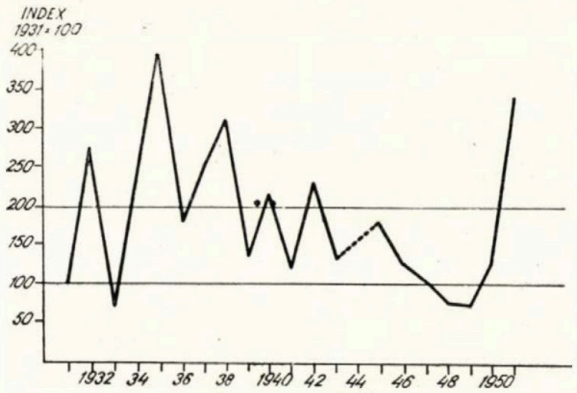


Abb. 2. Dysenterieerkrankungen in Ungarn

rung sich unter den Kranken immer mehr Personen befinden, die bereits eine Schutzimpfung empfangen haben.

Die Lage der Dysenterieerkrankungen ist weniger günstig. Die epidemiologische Arbeit gegen Bazillenruhr ist viel schwieriger als die gegen Typhus weil einesteils die Zahl der Bazillenträger viel grösser und anderenteils der Nachweis der Krankheitserreger bedeutend schwieriger ist, wobei auch die sonstigen Präventionsmöglichkeiten beschränkter sind (Abb. 2). Eben darum ist es von grosser Bedeutung, dass die Zahl der Ruhrerkrankungen in den Jahren nach der Befreiung stark abnahm, wozu sozusagen ausschliesslich jene Faktoren beitrugen, welche mit dem bereits erwähnten Ansteigen der hygienischen Kultur Hand in Hand gehen. Die Forschungen auf dem Gebiete der Ruhr begannen erst vor 1—2 Jahren im Staatlichen Institut für Volksgesundheitswesen wo besonders auf Grund der Arbeiten von *Serény* die Verbesserung der Laboratoriumstechnik und die Aufmerksamkeit der Ärzte auf diese Krankheit zu lenken angestrebt wurde. Grossenteils ist es dieser Arbeit zuzuschreiben, dass im Jahre 1951 die Zahl der gemeldeten Ruhrerkrankungen viel höher war als vorher. Die besseren diagnostischen Methoden ermöglichten es auch leichte und

früher als Darmkatarrh diagnostizierte Fälle zu erkennen. Es ist wahrscheinlich, dass man mit der Verbesserung und ausgebreiteteren Anwendung der Laboratoriumsdiagnostik immer mehr und mehr Ruhrfälle erkennen wird, so dass eine Erhöhung der gemeldeten Fälle zu erwarten ist. Die besseren diagnostischen Möglichkeiten bedeuten selbstverständlich nur den Beginn der Arbeit, die weiteren Aufgaben haben sich auf die präventiven Massnahmen zu beziehen.

Von den durch Tröpfcheninfektion verbreitenden Infektionskrankheiten muss zuerst die Diphtherie erwähnt werden. In dem Zeitraume vor der Anwendung der Schutzimpfungen meldete sich die Krankheit laut Budapester Angaben, in deutlichen Zyklen von 12—14 Jahren (Abb. 3). Die Anzahl der Erkrankungen im ganzen Lande steht nur seit 1931 zur Verfügung, aber auch dieser Zeitraum

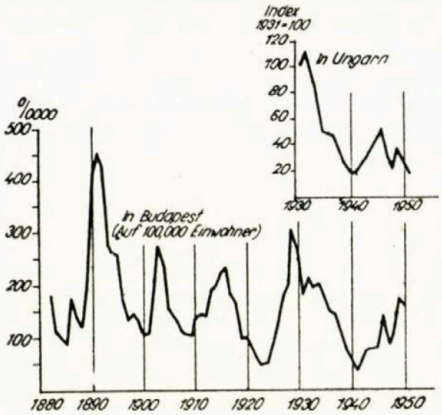


Abb. 3. Diphtherieerkrankungen

zeigt einen Zyklus von 14 Jahren. Da jedoch am Anfang der Periode die Welle der Epidemiekurve recht hoch war, erwies sich die nach Einführung der Schutzimpfungen folgende nächste Welle — im Jahre 1946 — als wesentlich niedriger.

Nach dem epidemischen Jahr 1932 wurde die Schutzimpfung nur auf engerem Gebiete, hauptsächlich bei Schuhlkindern angewendet, seit 1938 wurde sie dann bei den 2 und 6jährigen Kindern obligatorisch vorgeschrieben. Die Schutzwirkung der Impfungen zeigte sich nicht nur im Rückgang der Zahl der Erkrankungen, sondern auch in der Änderung der Altersverteilung der Kranken (Abb. 4). Als nämlich um 1932 der grösste Teil der Erkrankungen bei den Kindern zwischen 5—7 Jahren vorkam, verschob sich das Maximum der Morbiditätskurve nach Altersgruppen auf Einwirkung der Schutzimpfungen immer mehr nach links. Nach der Anordnung der Schutzimpfungen kamen die meisten Erkrankungen unter den jüngsten, nicht geimpften Kindern, also bei den 1—2jährigen vor.

Bei der Ausdehnung der Prävention bedeutete jene Verordnung einen weiteren Fortschritt, welche im Jahre 1947 die erste Impfung im Alter von 6 bis 12 Monaten, die zweite von 18—24 Monaten und die dritte im 6. Lebensjahr

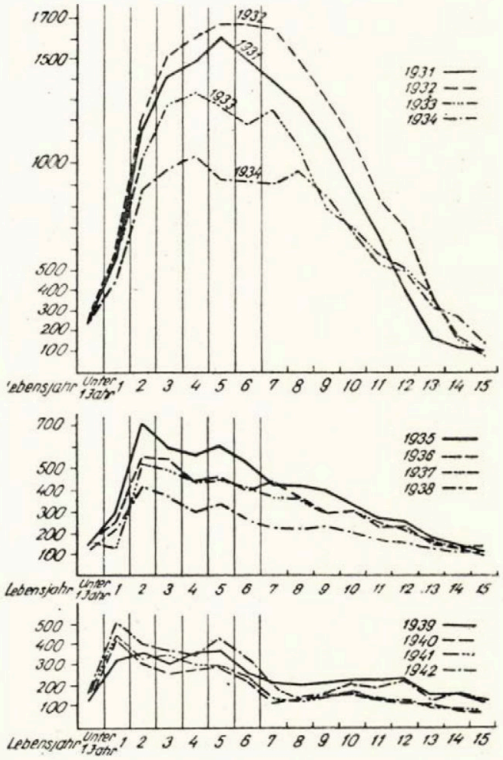


Abb. 4. Diphtherieerkrankungen nach Lebensalter 1931—42 (ohne Budapest)

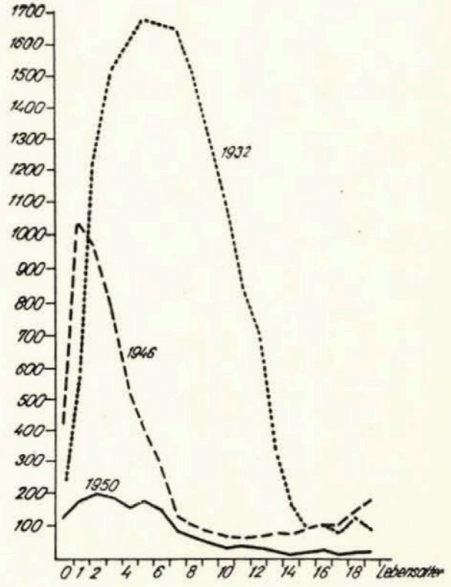


Abb. 5. Diphtherieerkrankungen nach Lebensalter (ohne Budapest)

als obligatorisch erklärte. Das Ergebnis der Schutzimpfungen lässt sich bei der Verteilung der Kranken nach Altersgruppen gut ablesen (Abb. 5). Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass es gelang auch in der jüngsten Altersgruppe einen bedeutenden Schutz zu erreichen. Für die jüngste Altersgruppe bedeutete jene Verordnung eine weitere Hilfe, welche im Jahre 1951 eine Wiederholung der ersten Schutzimpfung nach 4 Wochen vorschrieb. Dadurch soll auch für jene Säuglingen eine genügende Immunität gewährleistet werden, die zum Teil auf die erste Schutzimpfung noch mit unzureichender Antikörperbildung reagierten. Beim Vergleich der zwei letzten Epidemiekurven kann man feststellen, dass bei der letzteren unter den wenigstens zweimal geimpften Personen um 90% weniger Erkrankungen vorkamen als vorher.

In der bisher beobachteten periodischen Schwankung der Diphtherie wurde im Jahre 1949 eine unerwartete Zunahme festgestellt, uzw. besonders

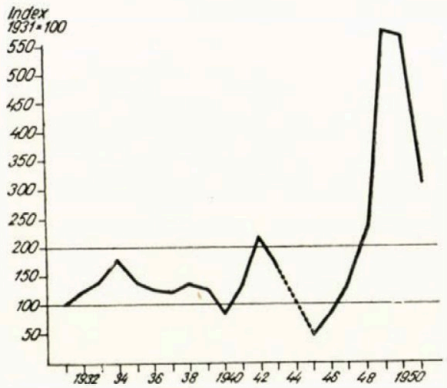


Abb. 6. Scharlacherkrankungen in Ungarn

in Budapest. Dies war dazu rückzuführen, dass die Kinder, deren Schutzimpfungen wegen des Krieges ausgeblieben waren, in diesem Jahre die am meisten gefährdete Altersstufe erreichten. Seither wurden die Impfungen nachgeholt, so dass zu hoffen ist, dass die Epidemiekurve in den nächsten Jahren unter die niedrigste, bisher registrierte Werte sinken wird.

Der Scharlach verursachte in den vergangenen Jahren eine weit ausgebreitete Epidemie, welche aber nicht nur in Ungarn, sondern auch in den meisten Ländern Europas wahrgenommen werden konnte (Abb. 6). Der Scharlach verursachte schon im Jahre 1942 eine kleinere Hyperendemie, welche sich aber bloss auf jenes Jahr lokalisierte. Die gegenwärtige Epidemie begann im Herbst 1948, in den Jahren 1949 und 1950 stieg die Zahl der Erkrankungen auf das 4—5fache im Vergleich zur Zahl der Erkrankungen vor der Epidemie an. Im Jahre 1951 milderte sich die Epidemiewelle wesentlich, so dass die Hoffnung besteht, dass sie schon 1952 auf das Niveau der Vorepidemiezeit zurückkehren wird. Diese weitverbreitete Epidemie wurde durch den verhältnismässig leichten

Verlauf der Krankheit gekennzeichnet, die Letalität schwankte um 0,3% und die Zahl der Komplikationen war wesentlich niedriger, als in anderen Jahren. Die Erkrankungen verschoben sich in die Richtung der jüngeren Altersgruppen. Da vor der Epidemie die meisten Erkrankungen unter den 5—8jährigen Kindern vorkamen, gehörten in dieser Epidemie die meisten Kranken der Altersgruppe der 3jährigen an.

Die Angaben über die Kinderlähmung stehen gleichfalls seit 1931 in verlässiger Weise zur Verfügung, aber auch schon vorher waren epidemische Jahren bekannt (Abb. 7). Aus diesen Angaben war es festzustellen, dass die Morbiditätskurve der Poliomyelitis sich in Ungarn meistens in Zyklen von 5 Jahren meldet, wovon es nur um 1940 eine Ausnahme gab. Letztens war sie im Jahre 1947 epidemisch und deshalb muss man die nächste Epidemie in diesem Jahre

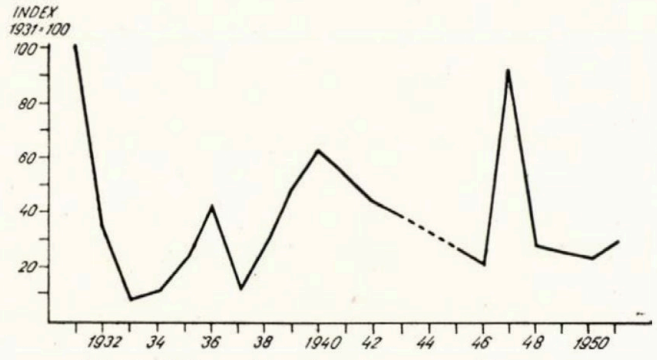


Abb. 7. Poliomyelitiserkrankungen in Ungarn

also 1952 erwarten. Das Gesundheitsministerium wird die entsprechenden Vorkehrungen treffen, dass uns die Epidemie nicht unvorbereitet findet.

Die Meningitis cerebrospinalis epidemica verursachte im Jahre 1940 eine weit ausgedehnte Epidemie, also zu jener Zeit, wo sie in den meisten Staaten Europas epidemisch war. Die Zahl der gemeldeten Erkrankungen war 30mal höher als zur Zeit vor der Epidemie und auch seither werden wesentlich mehr Fälle gemeldet als in der Vorepidemiezeit (Abb. 8).

In den Jahren 1946 und 1947 traten in einzelnen Teilen des Landes gutartig verlaufende meningitische Erkrankungen auf, die vor der Klärung der Ätiologie Meningitis serosa genannt wurden. Diese Krankheit kam in bestimmten Gegenden, besonders im westlichen Teil Transdanubiens recht häufig vor, wo sie mehrere Tausende Erkrankungen verursachte, während sporadische Fälle auch aus anderen Teilen des Landes gemeldet wurden. Die eingeleiteten Untersuchungen führten zuerst bei den sporadischen Fällen zu Erfolg, da es *Iványovics* im Jahre 1948 gelang aus einem Kranken aus der Umgebung von Szeged und aus den im Hause des Kranken gefangenen Mäusen das Virus der Choriomenin-

gitis lymphocytica zu züchten. Seither konnte *Iványovics* auch aus anderen Fällen das Virus isolieren, was auch *Molnár* in einem Budapester Fall gelang. Die späteren Untersuchungen zur Klärung der epidemisch auftretenden Erkrankungen von Meningitis serosa führten aber zu anderen Ergebnissen, da *Alföldy* und *Füzy* bei einer grossen Zahl von Fällen in Transdanubien Leptospiren nachzuweisen vermochten. Nicht nur aus den Kranken, sondern auch aus den auf den verseuchten Gebieten gefangenen Feldmäusen wurden Leptospiren in grosser Zahl nachgewiesen und damit bestätigt, dass die durch Leptospiren hervorgerufene Meningitis in gewissen Teilen des Landes epidemisch vorkommt.

Die Prävention gegen den Tetanus wurde im vergangenen Jahre (1951) auf neue Grundlagen gelegt, da das Gesundheitsministerium in den 6, am meisten

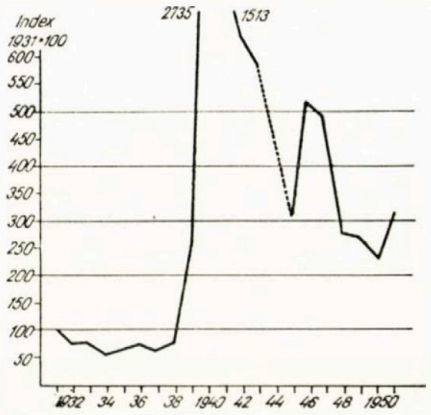


Abb. 8. Meningitis c. ep. Erkrankungen in Ungarn

verseuchten Bezirken, die aktive Tetanus-Schutzimpfung der Bevölkerung von 10 bis 20 Jahren, und ohne Rücksicht auf das Lebensalter der Arbeiter bestimmter Berufe anordnete. Es stehen noch keine endgültigen Ergebnisse zur Verfügung, da im Jahre 1951 nur die ersten zwei Impfungen verabreicht wurden. Die dritte Impfung findet erst in diesem Jahre, also 1952 statt, doch zeigen schon die ersten Impfungen gewisse Erfolge.

Über die übrigen Infektionskrankheiten ist derzeit nichts besonderes zu berichten.

Zum Schluss sei festgestellt, dass die epidemiologische Lage Ungarns — abgesehen von der Scharlachepidemie — als befriedigend anzusprechen ist. Es ist gelungen, die während des zweiten Weltkrieges aufgetretenen Krankheiten erfolgreich zu bekämpfen und auch gegen andere Infektionskrankheiten gute Ergebnisse zu erzielen.

SIEBEN JAHRE DER GEWERBLICHEN UND AGRONOMISCHEN MIKROBIOLOGIE IN UNGARN

A. PELC

Forschungsinstitut für die Gärungsindustrie, Budapest

In Ungarn hatte man vor der Befreiung im Gebiet der landwirtschaftlichen und besonders der industriellen Mikrobiologie nur wenig geleistet. Diejenigen Institute, wo mikrobiologische Forschungen ausgeführt wurden, hatten in ziemlicher Entfernung vom praktischen Leben gearbeitet; die erzielten praktischen Resultate wurden selten in die Praxis überführt. Die wirtschaftliche Ausstattung der Forschungsinstitute und der Gehalt der Forscher war notdürftig. Die wissenschaftlichen Mitglieder der Forschungsinstitute waren gezwungen, zwecks Aufrechterhaltung ihres Institutes und ihres eigenen Daseins Arbeiten zu unternehmen, womit sie Geld verdienen konnten, und hatten gegen bescheidene Entlohnung schablonenhafte Untersuchungen, Analysen ausgeführt. Sie waren mit bürokratischer und Routinarbeit überfüllt. Man muss jedoch feststellen, dass einige begeisterte Forscher von umfassendem Wissen auch unter diesen ungünstigen Verhältnissen bedeutende Resultate erzielt hatten, in vielen Fällen leisten diese Ergebnisse auch der heutigen Forschungsarbeit grosse Hilfe.

In dem Jahre 1945 hatte sich auch auf diesem Gebiete eine grosse Änderung eingestellt. Mit der Befreiung des Landes wurden jene Schranken gestürzt, die uns von der Sowjetwissenschaft getrennt hatten, wir konnten nun die mächtigen Fortschritte kennen lernen, die in der Forschungsarbeit der Sowjetunion stattgefunden haben. In der Sowjetunion hatte man die wissenschaftliche Arbeit stets hochgeschätzt, die Forschungsarbeit hoch bewertet und unmittelbar nach der grossen Oktober-Revolution wurden die Grundlagen einer wissenschaftlichen Arbeit von grösstem Umfang ausgebaut. Die in der Sowjetunion erzielten, unvergleichlichen Resultate in Landwirtschaft und Industrie waren in erster Reihe Folgen der entsprechenden Organisation der wissenschaftlichen Forschung und der engen, planmässigen Zusammenwirkung zwischen Forschung und praktischem Leben.

Partei und Regierung hatten nach diesem Muster auch in unserem Lande die günstigen Möglichkeiten für die wissenschaftliche Forschung und somit auch für die Forschungsarbeit in der landwirtschaftlichen und industriellen Mikrobiologie geschaffen. Die vorhandenen, doch von dem praktischen Leben

teilweise abgesondert arbeitenden Institute wurden umgestaltet und neue Institute gegründet. Die weitere Entwicklung unserer Landwirtschaft und Industrie und in erster Reihe die Förderung unserer Lebensmittel- und chemischen Industrie wären bei einer Vernachlässigung der mikrobiologischen Forschung unmöglich. Ohne eingehende Kenntnis der Mikroflora des Bodens, ohne eine tiefgreifende Erforschung der Eigenschaften der schädlichen Mikroorganismen, Virusarten, kann die Landwirtschaft keiner weiteren Entwicklung entgegensehen. Ein jeder Zweig der Nahrungsmittelindustrie eröffnet uns eine unendliche Reihe mikrobiologischer Aufgaben, dies kann sogar mit Bezug auf die Mühlenindustrie behauptet werden, obgleich diese einen fast maschinellen Karakter hat. Es werden schon heute mehrere Grundstoffe der chemischen Industrie durch Mikroorganismen produziert und im Laufe unseres Fünfjahrplanes müssen wir noch weitere solche Grundstoffe herstellen.

Ich möchte nun die verehrten Mitglieder des Kongresses durch einige kurzen Beispiele, mit den wichtigsten Richtungslinien unserer landwirtschaftlichen und industriellen mikrobiologischen Forschung bekannt machen.

Das *Forschungsinstitut für Ampelologie* umfasst in seinen acht Abteilungen die gesamten Probleme der Rebenkultur und Weinproduktion. Die bakteriologische Abteilung des Institutes hatte durch fünfzigjährige Arbeit eine reiche Weinhefe-Sammlung angelegt. Die Hefen wurden von den Trauben der verschiedenen Weindistrikte gesammelt und rein gezüchtet, die einzelnen Stämme hatte man von dem Gesichtspunkte der Wissenschaft und der Praxis weitgehend studiert. Die Sammlung ist weltbekannt, besonders durch die Weinhefe »Tokaj 22«, die bisher den grössten Alkoholgehalt, (18,37 vol %) produzierte aus Mosten mit hohem Zuckergehalt (31 vol %). Zur Zeit der Weinlesen werden mehrere Hunderte von Weinhefe-Reinkulturen in verschiedene Teile des Landes versendet, um den ungestörten und vollkommenen Ablauf der Gärung zu sichern. Durch diese Arbeit des Institutes wird die Qualität der ungarischen Weine in hohem Grade gefördert. Es wurden auf mehreren Hefestämmen genetische Untersuchungen ausgeführt und mit Hilfe des Mikromanipulators Einsporen-Kulturen hergestellt. Im Laufe der Untersuchungen der auf den Trauben vorkommenden Mikroorganismen hatten die Forscher des Institutes 500 verschiedene Schimmelpilze gesammelt, systemisiert und identifiziert. Es werden im Institute Untersuchungen über die Edelfäulnis hervorrufende Bothrytis cinerea ausgeführt, diese Arbeit ist vom Gesichtspunkte der Ausbruchweine wichtig.

Das *Institut für Pflanzenkunde der Agrarwissenschaftlichen Universität in Sopron* hatte, auf Basis einer internationalen Mitwirkung, die Verbreitung der in Ungarn vorkommenden Bodenbakterien aufgearbeitet. In Zusammenhang mit dieser Arbeit wurden neue bakteriologische Verfahren ausgearbeitet, z. B. ein Verfahren für die unmittelbare Zählung der Bodenbakterien mittels Schmierpräparate ; das Cholodni-Plattenzählverfahren wurde modifiziert und mit einer Färbemethode ergänzt. Das Institut hatte sich mit der bodenbiologischen,

naturumändernden Arbeit der Erforschung von Sodaböden eingehend befasst und auch das Bodenbearbeitungssystem von Wiljams wurde, das ganze Land betreffend, einem tiefgreifenden Studium unterworfen.

Es wird die Wechselwirkung zwischen der chemischen Reaktion und der Bakteriumzahl erforscht, in Zusammenhang mit dem R-Gesetz. Die bakteriologischen, sowie bodenbiologischen Einflüsse der emittierten Elementstrahlungen werden geprüft. Die Arbeit erstreckt sich in weitem Umfange auf die Erforschung der Mikrofauna der Waldungen und der landwirtschaftlichen Böden. Das erste ungarische Handbuch über Bodenphysiologie steht unter Bearbeitung.

Die Zentralaufgabe des *Agrobiologischen Forschungsinstitutes der ungarischen Akademie der Wissenschaften* besteht in der Forschung und in der gelenkten Veränderung der Stoffwechseltypen bei höheren Pflanzen sowie bei Mikroorganismen. Es werden Untersuchungen ausgeführt um den Stoffwechseltypus bei Bakterien, phytopathogenen und anderen Pilzen festzustellen. Die vegetative Hybridisation der Bakterien wird ebenfalls studiert. Die Forscher des Institutes befassen sich mit der bakteriellen Induktion der Differenzierung der höheren Pflanzen und mit der Ausarbeitung von mikrobiologischen Bestimmungsmethoden.

Die Hauptaufgabe der *Bodenbiologischen Abteilung des Agrochemischen Forschungsinstitutes* besteht in dem Studium der Probleme des Bakteriumdüngers und in seiner je schnelleren Überführung in die Praxis der Bodenverbesserung. Mit dem Rhizobium-Bakteriumdünger wurden schon bisher bedeutende Resultate erzielt, mit der Einführung der Azotobakterkulturen in den Böden wurde die Arbeit auf Grund sowjetischer Erfahrungen auch ins Werk gesetzt. In der letzten Zeit hatte die Abteilung einen bedeutenden Teil der Ausarbeitung der Methoden für die Behandlung und Anwendung des organischen Düngers ausgeführt.

Es sind Studien im Gange über den bakteriologischen Abbau des Zellstoffes, sowie über den schollenbildenden Einfluss der Humusstoffe. Auch die verschiedenen Fragen der Methodik für die Ermittlung der biologischen Bodenaktivität bilden eine Aufgabe der Abteilung.

Das *Forschungsinstitut für Pflanzenschutz* befasst sich mit dem Studium bzw. mit der Bekämpfung von Insekten-Schädlingen, mit durch Pilze, Bakterien und Virusarten hervorgerufenen Pflanzenerkrankungen. Von den verschiedenen Aufgaben des Institutes seien bisher die mit der Brusone-Krankheit des Reises verbundenen Untersuchungen erwähnt. Es wurde festgestellt, dass der Pilz Piricularia orysae und die Pseudomonas-Bakterien zu den Schwachparasiten gehören, daher zu denen die ihre verwüstende Wirkung nur in dem Falle ausüben, wenn die normale Entwicklung des Reises durch schädliche Witterungsverhältnisse oder technische Einflüsse gehindert wird.

Das Institut hat einen bedeutenden Erfolg erreicht in der Ausarbeitung des biologischen Pflanzenschutzes gegen den amerikanischen weissen Bärenspinner, indem man durch Anwendung von einer, von den Raupen der Mehlmotte vermehrten sporenbildenden Kultur des Bacillus thüringiensis, durch künstliche Infektion überführt, ein Vertilgungsergebnis von 60—100% erreicht hatte. Mit Bezug auf die Viruskrankheiten wurde deren Verbreitung durch die Saat dem Studium unterworfen; es wurde der durch Virus hervorgerufene Verfall der Erdäpfel und die schnelle Feststellung der Erkrankung durch Hilfe von serologischen Schnellmethoden studiert. Ihre Bekämpfung wurde durch die Anwendung der Mitschurinschen Methode durch Herstellung von vegetativ-Hybriden bearbeitet. Ausserdem befasst sich das Institut mit den Viruskrankheiten zahlreicher Obstbäume und Nutzpflanzen.

Auf das Gebiet der Forschungen für industrielle Zwecke übertretend, soll aus der erfolgreichen Forschungsarbeit des *Landwirtschaftlichen Chemisch-Technologischen Institutes der Technischen Universität* in Budapest die mikrobiologische Herstellung des Grundstoffes des Vitamin C, der Sorbose hervorgehoben werden. Es gelang durch den Stamm des Acetobacter suboxidans, in einer Sorbitlösung von 15%, im Laufe von drei Tagen mittels eingeblasener Luft Sorbose herzustellen und zwar mit einer Ausbeute von 85%.

Es wurden diejenigen Mikroorganismen studiert, die bei der Hanfröste eine Wirkung ausüben. Die bestwirkenden Kulturen wurden auch in den Hanfrösten ausprobiert und es gelang somit die Zeitdauer des Hanfröstens um 30% zu verkürzen, die Zugfestigkeit der Rohfaser wurde gleichzeitig um 38—40% gehoben. Die auf diese Weise hergestellten Fasern sind heller und können dem besten italienischen Produkt gleichgestellt werden.

Das Institut befasst sich mit Herstellung von proteolytischen Enzymen auf mikrobiologischem Wege, zwecks Anwendung in der Lederbeize. Weiter werden auch verschiedene Grundstoffe für die Arzneiindustrie mikrobiologisch hergestellt.

Die Thematik des *Ungarischen Forschungsinstitutes für Biologie* in Tihany betrachtend, soll die mikrobiologische Oxydation der Sterine hervorgehoben werden. So gelang es zum erstenmal auf biologischem Wege 7-dehydro-Cholesterin herzustellen. Das Resultat bildet die Basis für die industrielle Herstellung der Sterine.

Die Alkohol-Adaptation der Hefe betreffende Studien sind vom Gesichtspunkte der Alkoholfabrikation im Grossbetrieb von Interesse. Durch die Möglichkeit, Maischen von höherem Alkoholgehalt herzustellen, werden die Unkosten der Fabrikation bedeutend vermindert.

Es sollen hier diejenigen Arbeiten des *Pathologischen und Mikrobiologischen Institutes der Medizinischen Universität in Szeged* erwähnt werden, die mit der Industrie in Beziehung stehen. In dem Institut wurden Forschungen ausgeführt um die optimalen Verhältnisse für Dextranproduktion mit dem Leuconostoc

mesenteroides aufzuklären und es wurde die dextranbildende Fähigkeit von mehreren Stämmen untersucht. Die teilweise hydrolisierte Fermentationslösung wird als Blutplasmaersatz benützt. Das Verfahren hatte man — zwecks technischer Weiterentwicklung — dem Zentralinstitut für Industrielle Biochemie übergeben.

Das Institut hatte sich auch mit Herstellung von Zitronensäure und Butylalkohol-Aceton, mittels Gährung, befasst.

Aus der Reihe derjenigen Institute, die unmittelbar für die Industrie arbeiten, behandelt das *Forschungsinstitut für die Konserven-Fleischindustrie und für Kältetechnik* hauptsächlich die Technologie und Chemie der Nahrungsmittel pflanzlichen oder tierischen Ursprunges. Neben Problemen von technischem Charakter bildet die partielle oder gänzliche Vertilgung der in den Nahrungsmitteln vorhandenen Mikroorganismen eines der Zentralprobleme der Forschungsarbeit des Institutes. Auf diesem Gebiete befasste sich das Institut mit dem Studium der Wärme- und Kältetoleranz der Mikroorganismen, speziell mit dem Charakter der Wärmetoleranz gewisser Mikroorganismengruppen, mit besonderer Hinsicht auf die Qualitätverbesserung der Dosenkonserven und der tiefgekühlten Ware. Die Standardisierung der Verfahren für die Keimzahlbestimmung die man zur Charakterisierung des hygienischen Zustandes der Nahrungsmittel verwerten kann, ist von hoher praktischer Bedeutung. Aus theoretischem und praktischem Standpunkt ist es gleich wichtig ein neues und besseres Verfahren für die Bestimmung der Zellenzahl für Reinkulturen auszuarbeiten. In den vergangenen Jahren wurde eine intensive Arbeit in bezug auf die Bekämpfung der Krankheiten der Tomatenpflanze ausgeführt, hauptsächlich auf konservtechnische Gesichtspunkte gerichtet. Auf dem Gebiet der chemischen Konservierung befasste das Institut sich besonders mit der Anwendung und Wirkungsmechanik der Schwefligensäure sowie mit der Schwefligsäure-Toleranz der Hefe. Ein Studium der Atmungsvorgänge der Mikroorganismen, sowie die weitere Entwicklung der papierchromatographischen Verfahren zur Zucker-Protein- und organischer Säurebestimmung zwecks Verfolgung der Gärungsvorgänge ist auch im Gange. Zwecks mikrobiologischer Verwertung von Nahrungsmittelabfällen befasste sich das Institut mit Herstellung von Pektinase- und Pektase-Enzymen, die durch Spaltpilze produziert werden. Es wurden neuere Verfahren für die Herstellung des Pektins aus inländischen Stoffen ausgearbeitet und mit dieser Arbeit verknüpft, Studien über die Struktur von Pektinstoffen ausgeführt. Es wurde eine Mustersammlung von Mikroorganismen-Reinkulturen zusammengestellt, für den Bedarf der Industrie und der verschiedenen Forschungsinstitute.

Das *Forschungsinstitut für die Gärungsindustrie* wurde ebenfalls zur unmittelbaren Bedienung der Industrie aufgestellt, seine Aufgabe bezieht sich auf die weitere Entwicklung der Technologie der Spiritus-, Bier-, Hefe-, Essigfabrikation und der verschiedenen anderen Zweige der Gärungsindustrie und auf die Einführung neuer Gärungsvorgänge in die Praxis. Aus den Arbeiten

des Institutes seien die Untersuchungen über die Aminosäureassimilation der Saccharomyces- und Torulahefen erwähnt, womit man das Problem der Verwertungsmöglichkeit der Melasseschlempe lösen will. Die Aminosäureassimilation wurde auch mit Bezug auf die Beeinflussung der Fuselölproduktion studiert, welches Fuselöl im Laufe der alkoholischen Gärung gebildet wird. Bei diesen Forschungen wurden die diesbezüglichen Ermittelungen von Ehrlich revidiert. In der Technologie der Hefefabrikation wurden bedeutende Veränderungen ausgeführt, um die Möglichkeit für eine sehr bedeutende Kapazitätsverbesserung der Hefefabriken zu sichern. Es wurde die Vergärbarkeit von Pentoselösungen untersucht, die bei der Säurehydrolyse des Zellstoffes gebildet, und zur Herstellung von Futterprotein verwertet werden. Für die gärungstechnologische Herstellung von Butanol und Aceton, beide in der chemischen Industrie unentbehrlich, wurden Bakterienkulturen gezüchtet, die auch aus Melasse eine entsprechende Ausbeute erreichen. Mit Bezug auf die Bierfabrikation wurden mehrere Bierhefestämme gezüchtet, die Reinkulturen wurden der Industrie übergeben. Die Industrie erreichte durch die Anwendung dieser Hefen eine gleichmässigere Gärung, eine bessere Ausbeute und Qualität. Es wurde ein Verfahren für den Nachweis von das Bier infizierenden Sarcinen ausgearbeitet. Das neue Verfahren beruht auf der Anwendung von Nährböden verschiedener Zusammensetzung.

Mit Bezug auf die Spiritusfabrikation wurde der Zusammenhang zwischen der Gärungsgeschwindigkeit und der Hefemenge der Maische bestimmt und eine bessere Ausnützung der Gärungsbottiche in den Spiritusfabriken ermöglicht.

Ich wollte den geehrten Kongressmitgliedern durch die aufgezählten Beispiele nur mit einem Orientierungsbilde dienen über jene Forschungsarbeit, die in Ungarn auf dem Gebiet der landwirtschaftlichen und industriellen Mikrobiologie ausgeführt wird.

Ich halte es für gesichert, dass der Kongress der Ungarischen Mikrobiologischen Gesellschaft, vor allem aber die Teilnahme zahlreicher Fachmänner der volksdemokratischen Länder, der ungarischen mikrobiologischen Forschung einen weiteren Aufschwung verleihen wird. Unsere ausländischen Gäste leisteten, durch die freundliche Übergabe ihrer Erfahrungen, eine recht wertvolle Hilfe. Aus den hier aufgezählten wenigen Resultaten ist es schon ersichtlich, dass in der nächsten Zukunft mehrere, bereits beendete Forschungsarbeiten ihre praktische Verwertung erreichen werden. Mit diesen Resultaten werden die Forscher der landwirtschaftlichen und industriellen Mikrobiologie auch weitgehend zur Verwirklichung unseres Fünfjahrplanes beitragen und somit auch an dem Bau des Sozialismus und damit an der Verteidigung des Friedens weitgehend mitarbeiten.

DIE ENTWICKLUNG DER ANTIBIOTIKUMFORSCHUNG IN UNGARN

T. VÁLYI-NAGY

Institut für Pharmakologie der Medizinischen Universität, Debrecen

Zu Beginn der dreissiger Jahre unseres Jahrhunderts begann eine neue Periode im Studium des mikrobiologischen Antagonismus, oder — anders benannt — der Antibiose. — Das Motiv hierzu lag zweifelsfrei darin, dass die Oxforder Forschergruppe 1939—40 aus dem Kulturfiltrat des durch *Fleming* längst zuvor entdeckten Penicillium-Stammes im Penicillin ein Antibiotikum herstellen konnte, welches sich nicht nur als antiseptisches, sondern auch als chemotherapeutisch Mittel bewährte. Dies besagt so viel, dass der von dieser Forschergruppe isolierte Wirkstoff parenteral dargereicht in die Blutbahn gelangt und dort pathogene Mikroorganismen vernichtet oder in der Entwicklung derart stört, dass sie im Organismus vernichtet werden, ohne die Zellen des Wirtsorganismus zu lädieren. Die auf diesem Gebiete in der Zwischenzeit überall in der Welt erzielten Ergebnisse bilden eigentlich nur eine Erweiterung jener älteren Beobachtungen, die in Anschluss an die Entdeckung von *Pasteur* und *Joubert* (1877) von zahlreichen Bakteriologen, Botanikern und Ärzten gemacht wurden.

Dieser Aufschwung in der Antibioseforschung hat gewisse Wirkungen auf unsere Forschungsinstitute in Ungarn ausgeübt. Diese haben sich in den folgenden fünf Hauptrichtungen der einheimischen Forschung manifestiert :

1. Bestrebungen zur Einführung der im Ausland bereits bewährten Antibiotika in die pharmazeutische Industrie Ungarns ;

2. Forschung nach neuen Antibiotika ;

3. die Erforschung des Wirkungsmechanismus der bereits bekannten Antibiotika ;

4. Untersuchungen über pharmakologische Fragen im Zusammenhang mit der Anwendung der Antibiotika ; und

5. die Zusammenfassung der klinisch-therapeutischen und experimentellen Erfahrungen mit Antibioticis.

Im vorliegenden Bericht will ich vor allem auf die Ergebnisse der Zeitperiode nach der Befreiung unseres Landes eingehen, und hierbei in erster Linie über die in der Herstellung von Penicillin und Streptomycin erzielten

Ergebnisse, über die Erforschung neuer Antibiotika und über ungarische Versuche zur Klärung deren Wirkungsmechanismus berichten.

Die ersten, vor allem mit Penicillium-Stämmen durchgeführten Versuche fanden 1944/45 z. T. in Szeged, im Institut von Prof. *Iványovics*, sowie in den Laboratorien der Chinoin-Werke statt. In Ermangelung entsprechender Stämme und infolge Unorganisiertheit der damaligen Forschung erbrachten diese ersten Schritte keinerlei Ergebnisse.

In den Phylaxia-Werken ist 1946 eine Forschungsgruppe in Tätigkeit getreten, deren Zweck die Penicillinforschung war. Die Forscher der Phylaxia haben vor allem Oberflächenkulturen angelegt und 1947 konnten sie bereits das Antiseptikum *Fungin* in den Handel bringen, welches das sterile Filtrat oberflächen-kultivierter Penicillium-Stämme ist. Obzwar dieses Präparat zur parenteralen Anwendung ungeeignet war, war es in der Behandlung von Wunden, Pyodermien und Oberflächeninfekten von Nutzen.

In richtiger Einschätzung der volksgesundheitlichen und volkswirtschaftlichen Bedeutung der inländischen Herstellung von Penicillin, wurden die Penicillin-Forscher der Phylaxia im Herbst 1948 durch die Regierung — durch Vermittlung des staatlichen Planungsamtes — im Palikschen pharmazeutischen Werk konzentriert, das sich bereits von früher her mit der Fertigampullierung des vom Ausland eingeführten Penicillins beschäftigt hat. — Die in der Phylaxia angefangenen Versuche wurden also vom Herbst 1948 an im Palikschen Werk fortgesetzt. Hier wurde ein weiterer wichtiger Schritt zur Herstellung des Penicillins gemacht: im Frühjahr 1949 gelang es nach Überbrückung zahlreicher biologischer und technischer Schwierigkeiten erstmalig in einer Versenkkultur steril die Fermentierung durchzuführen bei ausreichendem Penicillin-Ertrag.

Im Herbst 1948 schalteten sich die Forscher des Chinoin-Werkes — nun im Besitze eines entsprechenden Stammes — in die weitere Arbeit ein, so dass von diesem Zeitpunkt an die Vorbereitung zur industriellen Herstellung des Penicillins an zwei Stätten vor sich ging. Zunächst begannen die Fermentierungsversuche im Chinoin in Laboratoriumsmassstäben, von Juli 1949 an aber bereits in halb-industriellem Ausmass. Nebst Forschung auf dem Gebiete der biologischen und Fermentierungsfragen in Zusammenhang mit der Penicillinherstellung gelang es einer zweiten Forschergruppe der Chinoinwerke, eine Methode zur krystallinischen Darstellung vom Penicillin G aus der Fermentierungsflüssigkeit auszuarbeiten.

Im Herbst 1949 wurde das Zentrale Biochemisch-Industrielle Forschungslaboratorium gegründet, zu dessen Aufgaben unter anderem auch die industrielle Antibiotikum-Forschung gehört. Auf dem Gebiete der Penicillin-Forschung waren von diesem Zeitpunkt an die Forschungsaufgaben zwischen dem Zentrallaboratorium (in ungarischer Abkürzung KÖBIKULA) und den Chinoin-Werken verteilt. Die Forscher im Zentrallabor waren bemüht, einen billigen industriellen

Nährboden zur Kultur des Penicillium notatum auszuarbeiten; die halbindustrielle Produktion von Penicillin blieb indes in den Chinoin-Werken. Die weitere Forschung wurde dadurch wesentlich erleichtert, dass als Ergebnis der Bemühungen im Zentrallabor auch in Ungarn die industrielle Herstellung des zur Kultur von Penicillium-Arten im Ausland bewährten Mediums Corn steep liquor unter der Bezeichnung Maismus begann.

1950 waren bereits jene Laboratoriums- und im halbindustriellen Betrieb gesammelten Erfahrungen vorhanden, welche die Grundlage einer vollindustriellen grossbetriebsmässigen Darstellung des Penicillins bilden. Über die Anordnung der Regierung begann im März 1950 die Planung zur Errichtung eines Werkes, das den gesamten Penicillinbedarf des ganzen Landes zu decken hat, zu gleicher Zeit aber der Bau eines 10 000 Liter umfassenden Fermentators in den Chinoin-Werken. Während die Planung und der Bau der neuen Penicillinfabrik plangemäss fortgesetzt wurden, begann die Rutinherstellung von Penicillin zum Allgemeingebrauch im November 1950 in den Chinoin-Werken auf dem im Zentrallaboratorium entworfenen optimalen Medium.

Die ersten Schritte zur industriellen Herstellung von Streptomycin wurden bereits von der Penicillin-Forschergruppe der Phylaxia unternommen. Im Gegensatz zur Penicillin-Forschung — wobei die Versuche von Anfang an mit einem industriell bereits benutztem Penicillium-Stamm durchgeführt werden konnten, wobei die reichlichen Erfahrungen der Sowjetunion und des übrigen Auslandes eine beachtliche Hilfe gewährten — waren die Voraussetzungen zur Vorbereitung der Streptomycin-Herstellung bei weitem nicht gleich günstig. Es stand uns kein geeigneter Streptomyces griseus Stamm zu Verfügung, der ohne weiteres industriell verwertbar gewesen wäre. Der zur Verfügung stehenden Stamm wies nur einen geringen Antibiotikum-Ertrag auf, so dass man sich zunächst bemühen musste, den Ertrag in der Antibiotikumproduktion zu erhöhen. Erst nach erfolgreichem Abschluss dieser Versuche konnten die Forscher des Zentrallaboratoriums (KÖBIKULA) die ersten Schritte zur Vorbereitung der industriellen Herstellung des Streptomycins unternehmen. Die Arbeit der Forscher war dadurch ganz wesentlich erschwert, dass die ausländische Literatur über die Streptomycin-Fermentierung sehr lückenhaft und wortkarg ist. Allen diesen Schwierigkeiten zum Trotze gelang es im Zentrallabor die Voraussetzungen zur Oberflächenkultur des Streptomyces griseus zu schaffen und parallel hiermit die krystallinische Darstellung des Wirkstoffes aus dem Nährboden zu verwirklichen.

1950 kamen die Forscher des Zentrallabors um einen wichtigen Schritt weiter, nach einjährigem Versuch gelang die Kultur des Streptomyces auch in Tiefenkulturen. 1950 wurde bereits ein Ertrag von 200 Einheiten pro Kubikzentimeter nicht nur in Laboratoriums-, sondern auch in 100 Liter fassenden halbindustriellen Fermentatoren erzielt. Zu dieser Zeit war die Reproduzierbarkeit der Fermentationsversuche noch mangelhaft, insbesonders wenn die

Streptomycin-Herstellung in grösseren, 300—1000 Liter fassenden Fermentatoren vor sich ging. Es war von entscheidender Wichtigkeit, das Medium des Fermentators, das richtige Verhältnis der Lüftung und Mischung, sowie die biochemischen Untersuchungen während des Fermentationsprozesse einzustellen. Die Ergebnisse der diesbezüglichen Forschungen haben nicht nur die Sicherheitsfaktoren der Streptomycin-Fermentierung geklärt, sondern die Aufmerksamkeit der Forscher auf einige fundamental wichtige Fragen der Mikrobiologie gelenkt. Die Versuchsergebnisse lassen nämlich vermuten, dass den Redox-Potentialen der Kultur bezüglich der Wirkstoff-Produktion eine entscheidende Bedeutung zukommt. — Auf Grund der späteren Ergebnisse der einschlägigen Forschung glauben wir hoffen zu dürfen, dass die genauere Erforschung des physikochemischen Verlaufes der Fermentierungsprozesse dem Aberglauben den Boden entziehen wird, dass die Durchführung einer guten Fermentierung einer Jongleur-Produktion gleichkomme. Diese Ergebnisse zeugen aber zugleich dafür, wie fruchtbar die Vertiefung der Beziehungen zwischen industriellen und perspektivischen Forschern ist, da die Letzterwähnten eben infolge des geringen Massstabes ihrer Versuche die gleichen Erkenntnisse unter keinen Umständen hätten erwerben können.

Im vorangehenden Abschnitt habe ich die Bemühungen der ungarischen Forscher kurz skizziert, die im Ausland bereits bekannten Antibiotika im Inland industriell herzustellen. — Ich will mich nun den Forschungen zuwenden, deren Ziel die Herstellung neuer Antibiotika ist. Die diesbezüglichen Forschungen beschränkten sich zumeist auf die Isolierung des antagonisierenden Stammes bzw. auf den Nachweis der Hemmungswirkung des Nährbodens. Viel weniger Versuche liegen über die Isolierung des wirksamen Stoffes vor. Letzten Endes gelang es auf dem Gebiete der Phytonzide und der Antibiotika in je einem Fall, den Wirkstoff in chemisch annähernder Reinheit herzustellen und in Tierversuchen zu prüfen. Über diese Forschungen will ich die nachfolgenden Einzelheiten mitteilen :

Iványovics und *Horváth* konnten 1947 in Szeged aus dem Rettich-Kern (Raphanus sativus L.) einen als Raphanin bezeichneten Stoff herstellen. Der Wirkstoff, eine syrup-dicke Flüssigkeit, enthält nebst C, H, O und N auffallend viel S. Er löst sich sowohl im Wasser, wie auch in den üblichen organischen Lösungsmitteln (ausgenommen Petroläther) gut. Er ist auf Gram-positive und Gram-negative Parasiten gleichsam wirksam, doch in Vergleich zu den allgemein gebräuchlichen Antibioticis in einer wesentlich höheren Konzentration. Der Wirkstoff erwies sich als toxisch, so dass er zur inneren Verabreichung und zu therapeutischen Versuchen ungeeignet ist.

1948 wurde von *Nékám* und *Polgár* die Erforschung der Wechselwirkungen der an der menschlichen Haut gedeihenden pathogenen und saprophytischen Pilzen und Bakterien zum Ziel gesetzt. Im Laufe der Arbeit konnte ein Sterigmatocystis-Stamm isoliert werden, der im Raulinschen flüssigen Nährboden

kultiviert wurde. Sowohl die Myzelien dieses Sterigmatocystis-Stammes, als auch der Nährboden enthalten einen Wirkstoff, das Sterigmatocystin, das das Wachstum der Staphylokokken zu hemmen vermag.

Im gleichen Jahr wurde von *Rauss* aus Pécs mitgeteilt, dass es ihm im Rahmen einer systematischen Suche nach antibiotisch wirkenden Mikroorganismen gelang, aus den Abwässern einen sporenbildenden Saprophyten zu isolieren, der dann als Bac. asterophorus Mayer identifiziert wurde. Der genannte Keim produziert ein Antibiotikum — genannt Ascasin —, welches im Rohzustand, in einer Verdünnung von 1 : 2000—1 : 8000 eine Reihe von — vor allem Gram-negativen — pathogenen Keimen in der Entwicklung hemmt, aber in höheren Konzentrationen auch auf Gram-positive Kokken wirksam ist. Die hohe Empfindlichkeit der Mitglieder der Shigella- und Salmonella-Gruppe diesem Stoff gegenüber ist von grosser Bedeutung. Die wässerigen Lösungen des Rohproduktes erweisen sich bei 100° C als beinahe uneingeschränkt thermostabil.

1949 begannen *Vályi-Nagy* und *Uri* in Debrecen sich mit einem Aktinomyces-Stamm zu beschäftigen, dessen Wirkstoff auf Gram-positive Krankheitserreger und Mikroorganismen der Mycobakteriumgruppe stärker wirksam als das Streptomycin ist. — Ein Jahr später schaltete sich als weiterer Mitarbeiter der Chemiker *Szilágyi* ein. — Es wurde durch weitergehende Forschung klargestellt, dass der Wirkstoff dieses unbekannten Aktinomyces-Stammes in der gleichen Weise die streptomycin-resistenten Varianten des Mycobact. tbc. zu hemmen vermag. Der Pilz gedeiht auf Nährböden, welche hydrolysierte Aminosäuren enthalten, sowie auf Corn steep liquor gut und weist eine beständige Antibiotikum-Produktion auf. Das Wachstum ist auch in versenkten und Schüttelkulturen ausreichend, die Antibiotikum-Produktion ist wohl etwas schwächer, aber zur Darstellung des Antibiotikums immer noch ausreichend. Der Wirkstoff ist nicht hitzeempfindlich. Nach Überwindung grosser Schwierigkeiten gelang es, den Wirkstoff in annähernd analytischer Reinheit aus der Fermentierungsflüssigkeit darzustellen. Der gereinigte Wirkstoff tötet bzw. hemmt die empfindlichen Mikroorganismen bis zu einer 50millionenfachen Verdünnung. In der jetzigen Form ist er auf Mäuse in der Menge von 2,5 mg/kg toxisch ; Ratten sind weniger empfindlich, die Resistenz von Kaninchen ist aber noch stärker ausgeprägt. Kaninchen parenteral einverleibt, ist der Wirkstoff im Blut der Tiere auch nach 6 Stunden mit Hilfe der allgemein-üblichen Ringtestmethode nachweisbar. Die Forschung war dadurch sehr erschwert, dass im Laboratoriumsmassstäben bisher nur wenig reiner Wirkstoff hergestellt werden konnte, so dass die Gesamtmenge des Ertrages zur Durchführung ausgedehnterer Tierversuche nicht ausreicht.

1950 wurde von *Novák* mitgeteilt, dass er bei der Untersuchung von 15 Pilzen der Penicillium-Gruppe zwei gefunden hat, denen eine antibiotische Wirksamkeit eigen ist. Der Wirkstoff des einen Stammes erwies sich sowohl

gegen Gram-negative, als auch gegen Gram-positiv Keime als aktiv. — Das antibiotisch wirksame Filtrat erwies sich als thermostabil. Es wurde durch weitere Untersuchungen klargestellt, dass der Wirkstoff an Kohle adsorbiert und mittels Chloroform eluiert werden kann. Das Rohfiltrat wirkte auf die Maus toxisch, während die durch fortgesetzte Reinigungsprozesse gewonnenen Fraktionen eine verminderte Toxizität aufwiesen.

1949 hat *Jeney* anlässlich der Untersuchung der antibiotischen Eigenschaften eines Penicillium chrysogenium Stammes festgestellt, dass der Pilz auf zuckerhaltigen Nährböden gegen pathogene Keime der Shigella-Gruppe eine starke Aktivität aufweist.

Im gleichen Jahr hat *Herpay* auf eine gegen das Corynebacterium diphtheriae wirksame Aspergillus-Art hingewiesen.

Es sind noch keine Publikationen erschienen, jedoch ist es mir aus persönlichen Informationen bekannt, dass im Biologischen Institut zu Tihany aussichtsreiche Versuche mit einem Stamm von Streptomyces aureofaciens unter Leitung von *Horváth* durchgeführt werden. Gleichartige Versuche laufen auch im Staatlichen Ernährungsforschungsinstitut unter Leitung von *Anna Csillag*.

Im dritten Teil dieses Berichtes will ich mich bemühen, kurz die Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus der bereits bekannten und im klinischen Gebrauch bewährten Antibiotika zu besprechen. Ich will vorausschicken, dass ich mich vorwiegend auf Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus des Penicillins beschränken will, da diese in letzter Zeit beachtenswerte Ergebnisse gezeitigt hat.

Bezüglich des Wirkungsmechanismus der Penicillins scheinen in der Literatur vor allem zwei Tatsachen hervorgehoben zu sein :

1. Das Penicillin wirkt auf die empfindlichen Bakterienarten auf die Art, dass es in ihrem Nukleinsäurestoffwechsel irreversible Veränderungen herbeiführt. Als Folge dieser Veränderungen verlieren die Zellen ihre Fähigkeit, Eiweiss zu synthetisieren, während nach der Meinung anderer die Eiweiss-Synthese in eine aphysiologische Richtung abgelenkt verläuft.

2. Das Penicillin ist ein spezifischer Inhibitor des bakteriellen Protein— oder des hiermit verknüpften, durch eine Disulfidbindung charakterisierten Metabolits.

Überblicken wir die seit Kriegsende und der Befreiung entstandene einheimische Literatur auf Grund dieser Leitmotive, so können wir feststellen, dass unter unseren Forschern beide Ansichten Vertreter gefunden haben. So wurde von *Mosonyi* und *Oblath* (1948) in klinischen Versuchen festgestellt, dass auf die Penicillin-Behandlung hin eine Änderung des Glutathiongehaltes des Blutes erfolgt. Die in diesen Untersuchungen gewonnenen Daten bilden eine Stütze der Hypothese, wonach die Penicillin-Wirkung auf einer Störung des im Bakterienleben überaus wichtigen Disulfid-Thiol-Systems beruht. Die jungen Bakterien,

welche gegen Penicillin überaus empfindlich sind, sind nach den Untersuchungsergebnissen zahlreicher Sowjet- und westlicher Forscher besonders reich an reduziertem Glutathion bzw. an freie SH-Gruppen enthaltenden Stoffen (Eiweiss). Auf die Einwirkung von Penicillin hin ist eine Abnahme der freien SH-Gruppen festgestellt worden, womit parallel eine Abnahme der Vermehrungsfähigkeit und Viabilität der Zellen erfolgt. Diese Theorie gibt indes auf die Frage keine Antwort, warum der Wirkungsmechanismus des Penicillins anders ist, als der übrigen, in grosser Zahl bekannten SH-Gifte. — Was die Untersuchungen der über die Einwirkung von Penicillin hin erfolgenden Änderungen des Nukleinsäure-Stoffwechsels anbetrifft, ist auf die von mir und meinen Mitarbeitern im Pharmakologischen Institut in Debrecen durchgeführten Untersuchungen hinzuweisen. Nach den jetzt bereits vorliegenden Ergebnissen dieser Untersuchungen ist der Schluss zulässig, dass durch Penicillin eine Depolymerisierung der für junge Bakterienformen charakteristischen hochpolymerisierten Nukleinsäuren eingeleitet wird, die mit einer abnormen Vermehrung der Nukleotidbestände der Zellen einhergeht. Bakterien, welche hochmolekulare Nukleinsäuren nicht enthalten — wie z. B. alte Formen —, ist dieses Phänomen nicht eigen. Diese charakteristische Änderung des Nukleinstoffwechsels manifestiert sich u. a. auch in den Grössenveränderungen der Bakterien in den verschiedenen Entwicklungsstadien. Aus unseren Versuchen geht indes nicht hervor, ob das Penicillin diese kennzeichnende Änderung der Nukleinsäuren unmittelbar auf die Nukleoproteine wirkend oder aber vermittels eines zwischengeschalteten Systems (vielleicht eines Disulfid-Thiol-Systems) bewirkt. In Gemeinschaft mit meinem Mitarbeiter *Zabos* bemühen wir uns um die Klärung dieses fehlenden Kettengliedes durch Untersuchung des Penicillinbindenden Systems der Staphylokokken.

Wertvolle Erkenntnisse gehen aus *Jeney*'s Bericht (1947) hervor, der auf Grund seiner Versuche zum Schluss gelangt, dass die durch Penicillin tangierten Zellen die nicht natürlichen d-Aminosäuren des Penicillin-Moleküls in die zelleigenen Eiweisskörper einbauen. Hierdurch büssen diese Zellen ihre Lebensfähigkeit ein. In weiteren Versuchen hat *Jeney* nachgewiesen, dass auf die Einwirkung von Penicillin in den Bakterien endotherme Reaktionen überwiegen. Diese über aus interessante Anschauungsweise wäre allerdings erst dann erwiesen, wenn im Bakterienprotein, welches während der Penicillinwirkung synthetisiert wurde, die Komponenten des Penicillin-Moleküls, das d-Dimethylcystein und das d-Serin nachweisbar wären. — Die Hypothese von Prof. *Jeney* ist durch die Tatsache stark gestützt, dass d-Aminosäuren an sich fähig sind, den Bakterienwachstum zu hemmen.

Hochgeehrte mikrobiologische Gesellschaft!

Es ist sehr verlockend, einen vollständigen Querschnitt der einheimischen Literatur über Antibiotika zu geben, doch wird eine solche Besprechung durch die mir zur Verfügung stehenden beschränkten Zeit unmöglich. Die Zahl der

klassisch-pharmakologischen und klinischen therapeutischen Ergebnisse ist so gross, dass sie alle in diesen kurzgefassten Bericht nicht aufgenommen werden konnten. Aus diesem Grund habe ich mich auf eine eingehendere Besprechung der industriellen Herstellung und des Wirkungsmechanismus der Antibiotika beschränkt.

Bevor ich meinen Bericht abschliesse, sei es mir gestattet, einige Worte über die Zukunft der ungarischen Antibiotikum-Forschung zu sagen. — Die Hilfe der Regierung unserer Volksdemokratie, der erneuerte Geist der Ungarischen Akademie der Wissenschaften haben die Antibiotikum-Forschung in Ungarn ermöglicht. Die Forscher dieses Gebietes sind nun über die Anfangsschwierigkeiten hinweggekommen, sie haben die methodischen Schwierigkeiten bewältigt und auf Grund der bisher geleisteten Arbeit reichliche Erfahrungen gesammelt. Die anlässlich dieses Kongresses zu veröffentlichenden neuen Daten zeugen dafür, dass für die Zukunft eine viel weitere Perspektive dieses Forschungszweiges offen steht. Die Forscher der Debrecener Medizinischen Universität berichten über 26 neue antibiotische Pilzstämme und über 66 neue Phytoncide; dies sind die Ergebnisse einer Forschergruppe, zu der noch Ergebnisse der übrigen Forschungslaboratorien unserer Heimat kommen. Die aus diesen Erfahrungen gezogenen Konsequenzen lassen eine Konzentrierung aller Kräfte dieses überaus wichtigen Forschungsgebietes für wünschenswert erscheinen, die sich im Rahmen eines experimentell-therapeutischen Institutes verwirklichen liesse. Diesbezüglich ist als eine erfreuliche Tatsache zu werten, dass — wie dies anlässlich der Akademischen Festwochen vor kurzem von einer massgeblichen Persönlichkeit bekanntgegeben wurde — die Akademie ihrerseits die Errichtung eines eigenen Forschungsinstitutes zur Lösung derartiger Aufgaben beabsichtigt. Die Errichtung eines solchen Zentralinstitutes ist schon aus dem Gesichtspunkte unerlässlich, weil die Antibiotikum-Forschung gewisser technischer Voraussetzungen bedarf, wie Fermentatoren grosser Kapazität, entsprechende Einrichtung zur Aufarbeitung der Fermentflüssigkeit, usw. — Der Mangel solcher technischer Hilfsmittel kann die Forschungsarbeit angebührlich in die Länge ziehen, mitunter zum Misserfolg verurteilen.

Die bisherigen Erfahrungen zeugen dafür, dass die Antibiotikum-Forschung Ungarns über die l'art pour l'art Periode hinausgewachsen ist. Für die Zukunft verpflichtet uns dies zur Rationalisierung und genauen Planung der einschlägigen Forschung. Unsere konkreten Aufgaben sind: wir müssen die systematische Forschung und Klärung der antibiotischen Stämme organisieren, um die einheimischen Stämme identifizieren zu können. Eine weitere Aufgabe ist, den Sinn der Antibiose als eines biologischen Phänomens zu klären, um der Natur auch dieses Geheimnis abzulauschen, um die Ergebnisse zum Wohle unseres Volkes und der arbeitenden Menschheit zu verwerten.

INDEX

Eörsi, M., Jablonszky, L. and *Milch, H.:* Significance of Bacteriophage in Infantile Enteral Infections. I. — Эрши, М., Яблонски, Д. и Милх, Х.: Значение бактериофага у детей грудного возраста при энтеральных инфекциях. I. ... 1

Форноши, Ф. и Мольнар, Э.: Клещевой энцефалит в Венгрии. Изоляция вируса и его свойства. — *Fornosi, F.* und *Molnár, E.:* Zeckenencephalitis in Ungarn. Isolation und Eigenschaften des Virus 9

Koczka, I.: Versuche über gleichzeitige Anwendung von Isonikotinsäure-Hydrazid und anderen gebräuchlichen Antituberkulosemitteln. I. — Коцка, И.: Опыты по совместному применению гидразида изоникотиновой кислоты (INH) с другими противотуберкулезными средствами. I. 23

Takátsy, Gy.: A Purified Precipitated Virus Obtained by a New, Simple Method. II. — Такачи, Ю.: Осадок вирусов, изготовленных новым, простым способом. II. 35

Pazonyi, B.: Studies on Sporulation in Yeasts and Some Problems of Improving Yeast Strains. — Пазоньи, Б.: Исследование спорообразования винных дрожжей и проблемы улучшения дрожжевых штаммов 49

Rauss, K. and *Kétyi, I.:* Comparative Studies on the Toxicity and Protective Value of S. flexneri and of its Isolated Somatic Antigen. — Рауш, К. и Кетьи, И.: Сравнительные исследования по токсичности и иммунобиологическому действию Shigella Flexneri и его изолированного соматического антигена..... 71

Farkas, E. and *Dömök, I.:* Isolation of Influenza C Virus in Hungary. — Фаркаш, Э. и Дэмэк, И.: Выделение типа »С« вируса гриппа в Венгрии..... 85

Dömök, I., Szafir, É. and *Farkas, E.:* Laboratory Investigations into the Influenza Epidemics of 1951 and 1952 in Hungary. — Дэмэк, И., Сафир, Э. и Фаркаш, Э.: Лабораторное изучение эпидемии гриппа в 1951 и 1952 гг. в Венгрии..... 99

Szöllősy, E., Ábrahám, A. and *Alföldi, L.:* Isolation of Influenza Virus Strains in Connection with the Epidemic in Szeged during the Year 1952. — Сэллэши, Э., Абрахам, А. и Альфэльди, Л.: Выделение штаммов гриппа во время эпидемии в г. Сегед в 1952 г. 111

Cserey-Pechány, É. und *Molnár, B.:* Untersuchungen des B_{12} Vitamingehaltes von Leberextrakten mit Anwendung elektrophoretischer und mikrobiologischer Methoden. — Череи-Пехань, Э. и Мольнар, Б.: Исследование количества витамина B_{12} в экстрактах печени применением электрофореза и микробиологических методов..... 115

Horváth, J.: Contributions to the Biology of Quantitative Changes in Antibiotic Production, Based upon Investigations on a Streptomyces Species. — Хорват, Я.: Данные к биологии количественного изменения производства антибиотика, полученные исследованием одного вида Streptomyces 131

Bodon, L. et *Szent-Iványi, M.:* Sur le phénomène d'interférence entre différents virus de peste aviaire dans l'oeuf de poule embryonné. — Бодон, Л. и Сент-Иваньи, М.: Явление интерференции между разными штаммами вируса чумы птиц в оплодотворенном курином яйце 141

Гаваш, А. И. и сотрудники: Антагонизм индивидуумов близких друг к другу видов, принадлежащих к одному роду в микробиологии. II. — *Havas, A.* und *Mitarbeiter:* Antagonismus der Individuen nahestehender Arten desselben Geschlechtes in der Mikrobiologie II. 149

Párducz, B.: Reizphysiologische Untersuchungen an Ziliaten. — Пардуц, Б.: Исследование физиологии раздражения у жгутиковых одноклеточных организмов I. 175

Török, P.: Mikroorganismen aus dem Wasser ungarischer Wasserleitungen. — Тэрэк, П.: Микроорганизмы из водопроводной воды в Венгрии..... 223

Pintér, M. und *Béládi, I.:* Die Züchtung des tschechoslowakischen Encephalitisvirus in Gewebekulturen. — Пинтер, М. и Белады, И.: Разведение вируса чехословацкого энцефалита в тканевой культуре 243

Sektionseinleitende Vorlesungen auf dem I. Kongress der Ungarischen Mikrobiologischen Gesellschaft

Rauss, K.: Sieben Jahre ungarischer medizinischer Bakteriologie und Immunologie (1945—1951) 251

Manninger, R.: Übersicht über die veterinärmedizinische Literatur auf dem Gebiete der Bakteriologie und der Immunitätslehre 1945—1951 265

Ivánovics, G.: Neuere Ergebnisse der Virusforschung in Ungarn 279

Kotlán, S.: Bericht über die Ergebnisse der parasitologischen Forschungsarbeit in Ungarn in den Jahren 1945—1951 289

Petrilla, A.: Aktuelle epidemiologische Fragen in Ungarn 298

Pelc, A.: Sieben Jahre der gewerblichen und agronomischen Mikrobiologie in Ungarn.. 307

Vályi-Nagy, T.: Die Entwicklung der Antibiotikumforschung in Ungarn 313

A kiadásért felel: Mestyán János — Műszaki felelős: Farkas Sándor
Kézirat beérkezett: 1953. IX. 10. Terjedelem: 28 (A/5) ív 79 ábra + 2 melléklet.

Akadémiai nyomda Budapest, Gerlóczy-utca 2. — 27658/54. — Felelős vezető: ifj. Puskás Ferenc igazgató.

Les Acta Microbiologica paraissent en russe, français, anglais et allemand et publient des travaux du domaine de microbiologie.

Les Acta Microbiologica sont publiés sous forme de fascicules qui seront réunis en un volume.

On est prié d'envoyer les manuscrits destinés à la rédaction, et écrits à la machine, à l'adresse suivante :

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

Toute correspondance avec la rédaction doit être envoyée à cette même adresse.

Le prix de l'abonnement est de 110 forints ($ 6,50) par volume.

On peut s'abonner à l'Entreprise pour le Commerce Extérieur de Livres et Journaux «Kultúra» (Budapest, VI., Sztálin-út 21. Compte-courant No. 45-790-057-50-032) ou à l'étranger chez tous les représentants ou dépositaires.

The Acta Microbiologica publish papers on microbiological subjects in Russian, French, English and German.

The Acta Microbiologica appear in parts of varying size, making up one volume.

Manuscripts should be typed and addressed to

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

Correspondence with the editors should be sent to the same address.

The rate of subscription to the Acta Microbiologica is 110 forints ($ 6,50) a volume. Orders may be placed with »Kultúra« Foreign Trade Company for Books and Newspapers (Budapest, VI., Sztálin-út 21. Account No. 45-790-057-50-032) or with representatives abroad.

Die Acta Microbiologica veröffentlichen Abhandlungen aus dem Bereiche der Mikrobiologie in russischer, französischer, englischer und deutscher Sprache.

Die Acta Microbiologica erscheinen in Heften wechselnden Umfanges .Mehrere Hefte bilden einen Band.

Die zur Veröffentlichung bestimmten Manuskripte sind, mit Maschine geschrieben, an folgende Adresse zu senden :

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

An die gleiche Anschrift ist auch jede für die Redaktion bestimmte Korrespondenz zu richten.

Abonnementspreis pro Band 110 Forint ($ 6,50). Bestellbar bei dem Buch- und Zeitungs-Aussenhandels-Unternehmen »Kultúra« (Budapest, VI., Sztálin-út 21. Bankkonto Nr. 45-790-057-50-032) oder bei seinen Auslandsvertretungen und Kommissionären.

80,— Ft

ACTA MICROBIOLOGICA

ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE

ADIUVANTIBUS

D. FEHÉR, J. HORVÁTH, G. IVÁNOVICS, S. KOTLÁN, R. MANNINGER, A. PELC, J. SZIRMAI

REDIGIT

A. HAVAS

TOMUS I FASCICULUS 4

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA

BUDAPEST, 1954

ACTA MICROBIOL. HUNG.

ACTA MICROBIOLOGICA

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA MIKROBIOLÓGIAI KÖZLEMÉNYEI

KIADÓHIVATAL: BUDAPEST, V., ALKOTMÁNY-UTCA 21.

Az Acta Microbiologica orosz, francia, angol és német nyelven közöl értekezéseket a mikrobiológia tárgyköréből.

Az Acta Microbiologica változó terjedelmű füzetekben jelenik meg. Több füzet alkot egy kötetet.

A közlésre szánt kéziratok, géppel írva, a következő címre küldendők:

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

Ugyanerre a címre küldendő minden szerkesztőségi levelezés.

Az Acta Microbiologica előfizetési ára kötetenként belföldre 80, külföldre 110 Ft. Megrendelhető a belföld számára az Akadémiai Kiadónál (Budapest, V., Alkotmány-utca 21. Bankszámla 04-878-111-46), a külföld számára pedig a »Kultúra« Könyv és Hírlap Kül. kereskedelmi Vállalatnál (Budapest, VI., Sztálin-út 21. Bankszámla: 43-790-057-181) vagy külföldi képviseleteinél és bizományosainál.

»Acta Microbiologica« публикует трактаты из области микробиологии на русском, французском, английском и немецком языках.

»Acta Microbiologica« выходит отдельными выпусками разного объема. Несколько выпусков составляют один том.

Предназначенные для публикации рукописи (в напечатанном на машинке виде) следует направлять по адресу:

Acta Microbiologica,
Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

По этому же адресу направлять всякую корреспонденцию для редакции.

Подписная цена »Acta Microbiologica« — 110 форинтов за том. Заказы принимает предприятие по внешней торговле книг и газет »Kultúra« (Budapest, VI., Sztálin-út 21. Текущий счет № 43-790-057-181), или его заграничные представительства и уполномоченные.

WEITERE VERSUCHSANGABEN ÜBER DAS ANTIBIOTIKUM „GRANEGILLIN"

Von
A. CSILLAG

Staatliches Institut für Volksgesundheitswesen, Budapest

Eingegangen am 10. Juni 1953

Vor einem halben Jahr wurde von der Verfasserin über die Isolierung eines Antibiotikums berichtet [1], welches — in vitro — sich hauptsächlich gramnegativen Mikroorganismen gegenüber als wirksam erwies. Der das Antibiotikum erzeugende Pilz wurde hierbei in einem Muster von dumpfigem Mehl gefunden. Nach Ausarbeitung entsprechender Fermentations- und Extraktionsverfahren konnte das Antibiotikum in kristallinischem Zustand dargestellt werden.

In der obenerwähnten Mitteilung wurde bereits festgestellt, dass das von der Verfasserin isolierte — Granegillin genannte — Antibiotikum in vielen Eigenschaften der Aspergillinsäure gleicht, obwohl es sich in einigen chemischen und biologischen Eigenschaften von dieser unterscheidet.

Da die Fermentation des Pilzes bisher nur im Laboratoriumsmassstab durchgeführt wurde, ist es erst jetzt gelungen, genügend Material zu sammeln, um Versuche zwecks Klarstellung der identischen oder verschiedenen Beschaffenheit dieser beiden Materialien anstellen zu können. Das Ergebnis der im Institut für Organische Chemie der Budapester Eötvös-Universität durchgeführten Untersuchungen wird in dem sich mit der Chemie des Granegillins befassenden Teil behandelt werden.

Im nachstehenden sollen ausser der Ergänzung der im obenerwähnten Präliminarbericht mitgeteilten Angaben auch noch therapeutische Versuche an Mäusen beschrieben werden. Das Resultat dieser Versuche konnte aber nicht mit dem Ergebnis der mit Aspergillinsäure ausgeführten Versuche verglichen werden, da in der Literatur nur eine sehr geringe Zahl von therapeutischen Versuchen mit Aspergillinsäure veröffentlicht wurde, wobei diese fast immer ein negatives Ergebnis zeitigten.

Beschreibung des das Antibiotikum erzeugenden Pilzes

Die Pilzkolonie entwickelt sich auf Czapek— Dox-Agar gut, wobei auch die Sporenbildung rasch einsetzt. Ihre Farbe ist anfänglich grünlichgelb, später bräunlichgelb. Unten ist sie anfänglich farblos, um später bräunlich zu werden. Die Konidienträger sind sehr kurz, grösstenteils 140—150 μ lang, selten noch länger

(200—250 μ), ihre Wand ist rauh, körnig. Das Vesiculum ist etwas oval, seine Breite beträgt im Durchschnitt 14—18 μ. Die Sterigmen sind in einer einzigen Reihe angeordnet. Die Konidien sind kugelförmig, fast glattwändig und haben einen Durchmesser von 4—4,5 μ. Der Pilz ist nicht ein typenmässiger Aspergillus flavus, sondern nähert sich in mancher Beziehung dem Aspergillus effusus.

Der Pilz wächst auf Bouillonnährboden äusserst rasch. Schon am zweiten Tage bildet er eine zusammenhängende Oberflächenkultur. Das Temperaturoptimum für sein Wachstum liegt bei 37°C, doch produziert er bei dieser Temperatur kein Antibiotikum. Wenn man den Pilz bei 26°C züchtet, setzt die Sporenbildung am 8. Tage ein, und in diesem Zeitpunkt erreicht dann die Produktion des Antibiotikums ihr Maximum. Auf zuckerhaltigem Nährboden wird der Pilz sehr schnell pleiomorph, was auch sonst eine häufige Erscheinung ist [2]. Nach den bisherigen Erfahrungen variiert er nicht.

Fermentation

Im Laboratoriumsmassstab wird die Fermentation bei pH 7,5 in einer Phosphatpuffer enthaltenden Pferdefleischbouillon vorgenommen. Die Züchtung erfolgt in Roux-Flaschen von 2 l, an der Oberfläche der Nährlösung. Die Inkubationstemperatur beträgt 26°C, die Inkubationsdauer 8—10 Tage. Der letzte pH-Wert der Fermentflüssigkeit ist 9. Die Antibiotikumerzeugung erreicht ihr Maximum am 8.—10. Tage. Mit dieser Methode kann 120—150 mg kristallinisches Antibiotikum je Liter gewonnen werden.

Isolierung

A) Die Fermentflüssigkeit wird durch Baumwollwatte filtriert, gesäuert und dann mit Chloroform extrahiert. Das nach der Verdunstung von Chloroform zurückgebliebene Material wird in Isopropylalkohol gelöst und dann zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wird verdunstet und der Rückstand in 0,1 n HCl gelöst. Bei dieser Säurekonzentration löst sich das Granegillin bereits in der gewünschten Menge, während es bei pH 3 noch unlöslich ist. Nach Filtrierung wird der Wirkstoff auskristallisiert.

B) Das Züchtungsfiltrat wird nach erfolgter Säuerung mit Chloroform extrahiert. Der nach der Evaporation des Chloroforms verbleibende klebrige Rückstand wird in Petroläther digeriert, wobei sich der Wirkstoff löst und im Petroläther unlösliche Verunreinigungen zurückbleiben. Die Lösung wird sodann mit 1%igem $NaHCO_3$ und nach Säuerung wiederum in Petroläther extrahiert. Durch dieses Vorgehen wird der Wirkstoff vom grössten Teil des aus Verunreinigungen bestehenden Pigmentes befreit. Das nach Verdunstung des Petroläthers erhaltene Präparat wird in 0,1 n NaOH gelöst, filtriert, mit Salzsäure auf pH 3 eingestellt, worauf sich das Antibiotikum in kristallinischem Zustand aus-

scheidet. Nach Filtrieren und Trocknen wird es dann aus Wasser oder aus Petroläther umkristallisiert.

Physikalische und chemische Eigenschaften

Das aus Wasser oder Petroläther kristallisierte Granegillin bildet blassgelbe, gleichmässig gewachsene, nadelförmige Kristalle. Das Material schmeckt bitter und hat einen charakteristischen Geruch. Es löst sich gut in Petroläther, in Chloroform, in der homologen Alkoholreihe und in anderen Fettlösungsmitteln. In Wasser löst es sich bei Erwärmung in Mengen von 1 mg/ml. Besser löst es sich in 0,1 n Lauge und in n Säure. Es ist thermostabil und verliert auch nicht nach 60 Minuten Sieden in 0,1 n HCl oder 0,1 n NaOH an Wirkungskraft.

Die chemische Analyse des Materials erfolgte im Institut für Organische Chemie der Budapester Universität. Vor der Analyse wurde das Material aus Petroläther (Siedepunkt 40—60°C) — in dem es sich übrigens gut löst — bei starker Kühlung dreimal umkristallisiert und dann in einem paraffinhaltigen Exsikkator bei Zimmertemperatur und danach in einer Vakuumpistole bei 80°C getrocknet. Der Schmelzpunkt des gereinigten Materials liegt bei 101—102°C. Auf Grund der analytischen Daten lautet die Formel für die Verbindung: $C_{12}H_{20}N_2O_2$.

Die berechneten und die festgestellten Angaben zeigen innerhalb der experimentellen Fehlergrenze eine gute Übereinstimmung:

berechnet	C 64,2	H 8,8	N,12, 48	Ms 224,3
festgestellt	C 64,7	H 8,9	N 1,5	Ms 229,4 (Rast, Kampfer) 224,3

Der Schmelzpunkt des Phenylhydrazinsalzes des Granegillins liegt bei 99—100°C, der seines 3,5-dinitrobenzoesauren Salzes bei 122—124°C. Mit Ferrichlorid zeigt es eine rote Farbreaktion (3).

Die sich in der Verbindung zeigenden halogenen Spuren stammen von dem 0,1% organisch gebundenen Chlor. Wenn man diese Angabe mit dem gefundenen Molekulargewicht vergleicht, so erscheint es wahrscheinlich, dass das Material von einer chlorhaltigen Verunreinigung begleitet wird.

Nach den — noch unveröffentlichten — Untersuchungen von *Cieleszky* zeigte sich das Material an der tropfenden Quecksilberelektrode sehr aktiv, was seine quantitative Bestimmung aus einer Menge von einigen wenigen Hundertstel Milligramm mit der polarographischen Methode ermöglicht.

Die optische Aktivität des Granegillins vermindert sich allmählich mit der Zunahme des Reinheitsgrades. Die optische Aktivität des einmal umkristallisierten Materials (Schmelzpunkt 93°C) beträgt $[a]_D^{24} = +10{,}9°$ (in Äthanol), die des zweimal umkristallisierten Materials + 8,8°, während sich das viermal

umkristallisierte Material selbst auf Grund paralleler Messungen als inaktiv erwies (gleichfalls in Äthanol).

Von den angeführten Eigenschaften stimmen sehr viele und entscheidende Eigenschaften (Molekulargewicht, Formel, Derivate) mit den von *White* im Jahre 1943 mitgeteilten Angaben der Aspergillinsäure überein [4]. Dagegen werden sowohl von *White* als auch von anderen Autoren mehrere chemische und biologische Daten über die Aspergillinsäure publiziert, die sich nicht mit denen des von der Verfasserin isolierten Granegillins decken.

So z. B. liegt der Schmelzpunkt der Aspergillinaäure nach *White* [4] zwischen 84—96°C, nach den meisten Autoren [5, 6, 7, 8] bei 93°C, während der Schmelzpunkt des Granegillins bei 101—102°C liegt.

Fast alle Autoren heben die Unlöslichkeit der Aspergillinsäure in Petroläther hervor [4, 5, 6, 9], während der Petroläther gerade eines der besten Lösungsmittel des Granegillins darstellt. *White* fügt noch hinzu, dass er bei einem Versuche, in dem er in einem anderen Lösungsmittel gelöste Aspergillinsäure mit Petroläther aus seiner Lösung ausfällen wollte, einen sich nicht kristallisierenden, amorphen, klebrigen Niederschlag gewann. Demgegenüber kann Granegillin aus seiner äthanolhaltigen Lösung — selbst im Falle hoher Konzentration — nicht mit Petroläther ausgefällt werden, und es entsteht hierbei keinerlei Niederschlag. Es sei noch erwähnt, dass sich die Aspergillinsäure nach *Dutcher* in Hexan löst [10].

Aspergillinsäure ist in kaltem Wasser praktisch unlöslich [3, 4, 5, 6] und löst sich auch in Säuren geringer Konzentration nicht [4,6]. Granegillin dagegen löst sich in kaltem Wasser schlecht, in 0,1 n Säure besser und in normaler Säure noch besser.

Ein Unterschied zeigt sich auch in der optischen Aktivität der beiden Materialien. Nach den Literaturangaben beträgt die optische Aktivität der Aspergillinsäure $[\alpha]_D^{24} = +13{,}4°$ $(+3°)$, wogegen beim Granegillin nur das nicht ganz reine Präparat in die Nähe dieses Wertes gelangt, während es in reinerem Zustand — bei Erhöhung des Schmelzpunktes über 100°C — immer weniger aktiv ist, was den Schluss zulässt, dass wahrscheinlich nicht das Material selbst optisch aktiv ist, sondern dass es von einem optisch stark verunreinigenden Material begleitet wird.

Es sei noch erwähnt, dass *Salvin* im Jahre 1946 ein Material isolierte [11], welches nach ihm der Aspergillinsäure sehr ähnlich, aber dennoch nicht mit ihr identisch ist, da das biologische Verhalten der beiden Materialien Unterschiede aufwies. Über dieses Material konnten keine weiteren Literaturangaben gefunden werden.

Spektrum in vitro

Zur Feststellung des Bakterienspektrums wurde ein mehrmals aus Petroläther umkristallisiertes Material verwendet, dessen Schmelzpunkt bei 101°C lag.

Das Antibiotikum wurde in Bouillon (oder in einem anderen Nährboden) gelöst, worauf die aus ihm hergestellten Verdünnungsreihen durch Hitzebehandlung sterilisiert wurden. Zur Inokulation wurde 0,5 ml aus der 100fachen Verdünnung von 24stündigen Bakterienkulturen zu insgesamt 5 ml Bouillon genommen. Die Inkubation bei 37°C dauerte 24—48 Stunden.

Die Bakterienstämme wurden von der Bakteriologischen Abteilung und vom Dysenterielaboratorium des Staatlichen Instituts für Volksgesundheitswesen zur Verfügung gestellt. Von den im Bakterienspektrum angeführten Mikroorganismen wurden 24 Shigella paradysenteriae-Stämme, je 6 Stämme von den übrigen Shigellen, je 4 Stämme von den Salmonellen und je 2 Stämme von den übrigen Mikroorganismen untersucht und die jeweiligen Extremwerte aufgezeichnet. Die so gefundenen Angaben sind aus Tabelle I ersichtlich.

TABELLE I

Mikroorganismus	Hemmungskonzentration γ/ml
Shigella paradysenteriae (Flexner)	1— 3,5
Shigella dysenteriae	4— 8
Shigella sonnei	4— 8
Shigella ambigua (Schmitz)	6
Salmonella typhosa	10— 20
Salmonella Pty A	12— 25
Salmonella typhi murium	12— 25
Salmonella Pty C (Hirszfeld)	12— 25
Salmonella enteritidis (Gärtner)	12— 25
Neisseria meningitidis	12— 25
Klebsiella pneumoniae	12— 25
Bacillus anthracis	20— 40
Brucella abortus	25
Clostridium perfringens	25— 40
Salmonella Pty B (Schottmüller)	25— 40
Staphylococcus albus	25— 50
Corynebacterium diphtheriae	25
Escherichia coli.....	40— 50
Neisseria gonorrhoeae	50
Staphylococcus aureus	50
Staphylococcus citreus	50—100
Diplococcus pneumoniae	100
Proteus vulgaris	200
Sarcina lutea	200
Pseudomonas aeruginosa	300

Granegillin gegenüber sind die Shigellen am empfindlichsten. Es hemmte die Vermehrung der Shigella paradysenteriae Flexner bei den meisten untersuchten Stämmen schon in einer Konzentration von 2 γ/ml, wobei nur wenige Stämme gefunden wurden, die erst bei einer Konzentration von 3,5 γ/ml zu wachsen aufhörten. Über eine solche Spezifität der Aspergillinsäure gegenüber den Flexnerstämmen wurde nirgends berichtet.

Im allgemeinen sind die gramnegativen Mikroorganismen dem Granegillin gegenüber empfindlicher als die grampositiven. Bei den untersuchten grampositiven Bakterienarten genügte nämlich zur Hemmung des Anthraxbazillus eine Konzentration von 24—40 γ/ml, während sich die übrigen Stämme als weit resistenter erwiesen. Unter den Stämmen, die eine höhere Konzentration als 50 γ/ml ertrugen, befanden sich nur zwei gramnegative, nämlich Proteus vulgaris und Ps. aeruginosa.

Bei der Untersuchung von Meningokokkus, Gonokokkus und Pneumokokkus wurde festgestellt, dass die zwei gramnegativen Kokken empfindlich sind, während sich der grampositive Pneumokokkus selbst bei einer Konzentration von 100 γ/ml vermehrt.

Nach den bisherigen Feststellungen erwies sich das Mycobacterium tuberculosis (H 37 Rv) bei Züchtung auf dem festen Coroninischen oder auf dem flüssigen Dubosschen Nährboden dem 10 000fach verdünnten Granegillin gegenüber als resistent, während es der Aspergillinsäure gegenüber nach mehreren Autoren (6, 12) selbst bei einer 80 000fachen Verdünnung empfindlich ist.

Die das Wachstum der Bakterien hemmende Wirkung des Granegillins ist in sauren Nährboden ausgeprägter als in alkalischen. Das kristallinische Granegillin beginnt bei einer Lagerung im Eisschrank (+4°C) nach 20 Tagen allmählich an Wirksamkeit einzubüssen. Nach drei Monaten sinkt sein Wirkungsgrad auf ungefähr die Hälfte des ursprünglichen. Wenn es aber in physiologischer Kochsalzlösung oder in Wasser gelöst in zugeschmolzenen Ampullen aufbewahrt wird, so nimmt sein Wirkungsgrad bei Lagerung im Eisschrank in den ersten 30 Tagen allmählich zu und beginnt erst am Ende des zweiten Monats etwas abzunehmen, doch kann eine wesentliche Abnahme des Wirkungsgrades selbst nach Ablauf des dritten Monates nicht wahrgenommen werden. Erfolgt die Lagerung bei Zimmertemperatur, so kann eine Erhöhung des Wirkungsgrades bloss einige Tage lang beobachtet werden, wonach dann eine allmähliche Verminderung eintritt, die nach 40 Tagen ganz ausgeprägt wird.

Toxikologische Untersuchungen

Zu den toxikologischen Untersuchungen wurde zweimal umkristallisiertes Material verwendet, dessen Schmelzpunkt bei 94°C lag. Die Untersuchungen wurden an weissen Mäusen durchgeführt. Zur intravenösen Injektion erfolgte die Lösung des Antibiotikums in einer 0,5%igen $NaHCO_3$-Lösung, während es zur

intraperitonealen, subkutanen und peroralen Verabreichung mit Hilfe von 10%igem Gummiarabikum in Wasser suspendiert wurde. Die perorale Verabreichung geschah durch eine Sonde.

Gummiarabikum- oder $NaHCO_3$-Lösung allein rief — wenn sie in derselben Weise und in derselben Menge wie beim toxischen Versuch in den Organismus des Tieres gelangte — keinerlei pathologische Symptome hervor.

Es wurden die DL_{50}-Werte bei intravenöser, intraperitonealer, subkutaner und peroraler Gabe festgestellt. Bei jeder Verabreichungsweise wurden je 2 Tiergruppen untersucht, wobei jede Gruppe aus 30 Mäusen bestand. Innerhalb jeder Gruppe erhielten die zweiten 6 Mäuse eine stärkere Dosis als die ersten 6, die dritten 6 eine stärkere als die zweiten 6 usf. Die DL_{50}-Werte wurden dann mit Hilfe eines Koordinatensystems berechnet. Die Mäuse stammten nicht aus derselben Zucht, was offensichtlich die Erklärung für die ziemlich grosse Streuung ist. In Tabelle II sind die Extremwerte der DL_{50}-Bestimmungen zusammengefasst.

TABELLE II

DL_{50}-Werte von Granegillin für Mäuse

Verabreichungsart	mg/kg Körpergewicht
Intravenös	80—100
Subkutan	140—170
Intraperitoneal	100—150
Peroral	200—320

Granegillin kann Mäusen in sechs Dosen bis zu täglich insgesamt 500 mg/kg Körpergewicht eine Woche hindurch injiziert werden, ohne dass pathologische Symptome auftreten.

An Meerschweinchen wurde die toxische Wirkung des Antibiotikums nur intraperitoneal untersucht. Der erhaltene DL_{50}-Wert betrug 250 mg/kg Körpergewicht.

Von den zu den toxikologischen Untersuchungen verwendeten Mäusen wurden zwei Stück — die das Antibiotikum in einer DL_{50} entsprechenden Menge erhalten und diese überlebt hatten — sowie chronisch mit Antibiotikum behandelte zwei weitere Mäuse nach 10tägiger Beobachtung verbluten gelassen und histologisch aufgearbeitet. Nach dem Untersuchungsbefund können in Milz, Leber, Lunge, Herzmuskel und Darm keine pathologischen Veränderungen wahrgenommen werden. Auch im Gehirn und im Adernbindegewebe des Nervensystems lassen sich keine auswertbaren Veränderungen feststellen.

Von den Tieren, die eine DL_{50}-Dosis erhalten hatten, trat bei einigen kurz nach der Injektion Hyperpnoë auf, die von heftigen Krämpfen begleitet war,

worauf dann nach 8—10 Minuten der Tod der Mäuse erfolgte. Das pathologische Sektionsbild der so verendeten Tiere zeigt keine spezifische Veränderung. Die histologische Untersuchung ergab einen Blutreichtum der parenchymösen Organe mit stellenweise kleineren Blutungen und ein leichtes Ödem der Lunge.

Wenn man das Ergebnis dieser toxikologischen Untersuchungen mit dem der Aspergillinsäure vergleicht, so ist ersichtlich, dass der DL_{50}-Wert der Aspergillinsäure — obzwar die älteren Literaturangaben einen höheren Wert erwähnen — nach den neueren Literaturangaben [7] an Mäusen bei intravenöser Verabreichung 48,5 mg/kg Körpergewicht beträgt. Die Aspergillinsäure ist also bei Injizierung i. v. ungefähr zweimal so toxisch wie das Granegillin.

Zur Feststellung der Wirkung des Granegillins auf die roten Blutkörperchen wurde eine 2%ige Suspension gewaschener Schaferythrozyten mit Granegillin verschiedener Konzentration in einem Wasserbad von 37°C während 2 Stunden inkubiert. Während dieser Zeit konnte selbst bei der höchsten Konzentration (200 γ/ml) keine Hämolyse beobachtet werden.

Therapeutische Versuche an Mäusen

Therapeutische Versuche wurden an Mäusen ausgeführt, die mit Klebsiella pneumoniae bzw. mit Salmonella typhosa experimentell infiziert waren. In beiden Versuchen wurden je 40 Mäuse verwendet, zur Kontrolle je 10.

Der zur Infektion benutzte Klebsiella pneumoniae-Stamm (von der Bakteriologischen Abteilung des Staatlichen Instituts für Volksgesundheitswesen) wurde an Mäusen über mehrere Passagen gezüchtet. Danach wurde seine Empfindlichkeit gegenüber Granegillin mit der üblichen Methode in vitro bestimmt. Der DL_{50}-Wert des Stammes betrug an Mäusen 0,1 ml intraperitoneal aus einer 100fachen Verdünnung einer 24stündigen Bouillonzucht.

Der DL_{50}-Wert des zur Infektion benutzten Ty_2-Stammes war 0,1 ml aus einer 1000fachen Verdünnung einer 5stündigen Bouillonzucht.

Die mit Klebsiella pneumoniae infizierten Mäuse waren 18—20 g schwere Tiere aus der eigenen Zucht des Staatlichen Instituts für Volksgesundheitswesen, während zu den mit Ty_2 durchgeführten Versuchen 18—20 g schwere, semmelfarbige Mäuse aus demselben Institut verwendet wurden.

Als Impfstoff wurde in jedem Fall in physiologischer Kochsalzlösung gelöstes, durch Hitzebehandlung sterilisiertes kristallinisches Granegillin in einer Konzentration von 1 mg/ml verwendet.

Die Infektion erfolgte intraperitoneal, die therapeutischen Impfungen wurden auf die gleiche Weise verabreicht. Die erste Granegillindosis erhielten die Mäuse gleichzeitig mit der Infektion, sodann wurde ihnen am ersten Tage noch viermal, am zweiten Tag noch dreimal Granegillin in 2stündigen Intervallen intraperitoneal gegeben.

Die Kontrolltiere erhielten zur gleichen Zeit und in der gleichen Menge nur physiologische Kochsalzlösung.

Aus dem Herzblut der eingegangenen Tiere konnte der infizierte Mikroorganismus in jedem Fall in reiner Zucht gewonnen werden.

Im Laufe der Versuche blieb kein einziges der Kontrolltiere am Leben. Dagegen überlebten auch diejenigen der behandelten Tiere, welche nicht geheilt wurden, die Kontrolltiere um einige (8—10) Stunden. Die Verhältnisse und Ergebnisse der Versuche werden in Tabelle III angegeben :

TABELLE III

	Klebsiella pneumoniae	Salmonella typhosa
Vollständige Hemmung in vitro γ/ml	15—25	10—25
Infektiöse Dosis im Vielfachen des DL_{50}-Wertes	100	10
Tägliche therapeutische Dosis mg/kg	30	60
Am Leben gebliebene Tiere %	50	40

Das Granegillin konnte bisher natürlich klinisch nur lokal ausprobiert werden. Seit Monaten sind indessen in verschiedenen Budapester Kliniken und Instituten Versuche in Verbindung mit verschiedenen Krankheiten im Gange, deren Ergebnisse als verheissungsvoll angesehen werden dürfen.

ZUSAMMENFASSUNG

Durch Fermentation eines zwischen Aspergillus flavus und Aspergillus effusus stehenden Schimmelpilzes wurde ein hauptsächlich gramnegativen Mikroorganismen gegenüber — in vitro — wirksames kristallinisches Antibiotikum hergestellt. Die Formel der Verbindung lautet $C_{12}H_{20}N_2O_2$. Sowohl seine Formel als auch sein Molekulargewicht sowie einige seiner Derivate sind mit den betreffenden Charakteristika der von *White* dargestellten Aspergillinsäure identisch, doch unterscheidet es sich von dieser in einigen chemischen und in mehreren wesentlichen biologischen Eigenschaften. Die vollständige Klarstellung der identischen wie der abweichenden Eigenschaften wird durch einen Vergleich mit der zu beschaffenden Aspergillinsäure möglich sein.

Das Granegillin genannte Antibiotikum erwies sich dem Flexnerbakterium gegenüber — in vitro — als spezifisch. Sein DL_{50}-Wert schwankt bei Mäusen intraperitoneal verabreicht zwischen 100—150, bei peroraler Gabe zwischen 280—320 mg/kg Körpergewicht.

Die mit der 100fachen DL_{50} von Klebsiella pneumoniae und mit der 10fachen von Salmonella typhosa experimentell infizierten Mäuse genasen in einem Verhältnis von 50 bzw. 40% nach einer zwei Tage dauernden Granegillinbehandlung (physiol. Kochsalzlösung, intraperitoneal).

Bei Menschen gelang es, bei lokaler Anwendung im Falle einiger Krankheitsprozesse gleichfalls ermutigende Resultate zu erhalten.

LITERATUR

1. *Csillag, A.:* Kísérletes Orvostudomány **5**, 32 (1953).
2. *Thom, C.* und *Raper, K.:* A Manuel of the Aspergilli, 1945.
3. *Csillag, A.:* Magyar Kémiai Folyóirat, im Druck.
4. *White, E. C.* und *Hill, H. H.:* J. Bact. **45**, 433 (1943).
5. *Baron, A. L.:* Handbook of Antibiotics. New York, 1950.
6. *Karel, L.* und *Roach, E. S.:* A Dictionary of Antibiosis. New York, 1951.
7. *Kavanagh, F.:* Advances in Enzymology **7**, 461 (1947).
8. *Menzel, A. E. O., Wintersteiner, O.* und *Rake, G.:* J. Bact. **46**, 109 (1943).
9. *Waksman, S. A.:* Microbial Antagonism and Antibiotic Substances. New York, 1951.
10. *Dutcher, J. D.:* J. Biol. Chem. **171**, 321 (1947).
11. *Salvin, S. B.:* J. Bact. **52**, 614 (1946).
12. *Goth, A.:* J. Lab. ans Clin. Med. **30**, 899 (1945).

НОВЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ ОБ АНТИБИОТИКЕ »ГРАНЕГИЛЛИН«

А. Чиллаг

Резюме

Путем ферментации плесневых грибков, принадлежащих к роду, занимающему место между Aspergillus flavius и Aspergillus effusus, удалось получить антибиотик кристаллического вида, являющийся эффективным — in vitro – в особенности по отношению к негативным по Граму бактериям. Формула соединения: $C_{12}H_{10}N_2O_2$. По формуле, молекулярному весу, а также в отношении некоторых производных данный антибиотик подобен аспергилловой кислоте, произведенной Уайтом, но отличается от нее по некоторым химическим и многим значительным биологическим свойствам. Вопрос различия и сходства между вышеупомянутыми будет решен по существу после приобретения аспергилловой кислоты, путем сравнения с последней.

Данный антибиотик, получивший наименование »Гранегиллин«, оказался специфичным — in vitro — по отношению к бактериям Флекснера. LD_{50} для мышей интраперитонеально колеблется между 100—150, а перорально между 280—320 мг. на 1 кг. веса.

Из мышей, подвергнутых экспериментальному заражению 10-ти кратной минимальной летальной дозой Klebsiella pneumoniae, после двухдневной терапии Гранегиллином (физиологический раствор, вводимый внутрибрюшинно), выздоровело 50%, а у мышей, зараженных единичной минимальной летальной дозой Salmonella typhosa, было отмечено 40%-ое выздоровление. У человека — применяя местную терапию — в некоторых случаях болезненных процессов тоже удалось достичь обнадеживающих результатов.

ÜBER DIE ZYTOTROPISCHE WIRKUNG AUF TUMORZELLEN

Von
GY. VAJDA, L. GORECZKY, I. ROTH und S. SÜMEGI

Aus dem Krankenhaus der Ungarischen Staatsbahnen

Eingegangen am 28. Juli 1953

In der Geschwulstdiagnostik erstrebten die Forschungen von Anfang an die frühzeitige Erkennung der Krankheit durch irgendein Laboratoriumsverfahren. Man hat eine ganze Reihe von Laboratoriumsuntersuchungen zur Aufstellung der Tumordiagnose herangezogen, doch haben sich bei Geschwülsten die Reaktionen als nicht spezifisch erwiesen. Weitere Bestrebungen in dieser Hinsicht schlugen verschiedene Richtungen ein.

In der ersten Gruppe erwähnen wir die Forscher, die in der Krebsdiagnose den Nachweis der durch die Geschwulst verursachten Stoffwechselstörungen zu verwenden versuchten. Die früheren Untersuchungen von *Sümegi* [21] zeigten, dass es bei mit transplantablem Krebs geimpften Ratten zur Entwicklung einer schweren Leber- und Nierenschädigung, dem sog. hepatorenalen Syndrom kommt. Parallel damit ist bei diesen Tieren eine Hyperfunktion der Schilddrüse und eine gesteigerte Hormonabsonderung des Hypophysenvorderlappens nachweisbar. Antihormone treten auch im Anschluss an die gesteigerte Funktion der Hypophyse im krebsigen Organismus in Erscheinung. *Rhodewald* [16] hatte das Antimelanophorhormon, *Sümegi* [21] und Mitarbeiter sowie *Eitel* [3] hatten das antithyreotrope Hormon, andere das antigonadotrope Hormon nachgewiesen. Der Nachweis dieser Hormone ist sehr einfach. Bei der Untersuchung des antithyreotropen Hormons wird das Patientenserum mit Hypophysenemulsion normaler Ratten zusammengebracht. Nach 2 Stunden im Thermostat wird das Gemisch einer gesunden Ratte injiziert, deren Sauerstoffverbrauch bereits mehrmals genau bestimmt wurde und daher bekannt ist. Am folgenden Tag wird das Verfahren wiederholt und der Sauerstoffverbrauch abermals bestimmt. Enthielt das Patientenserum Antihormone, so hatten diese das thyreotrope Hormon der Hypophyse gebunden, und der Sauerstoffverbrauch des Tieres nahm signifikant nicht zu ; waren dagegen im Serum keine Antikörper vorhanden, d. h. der Patient litt nicht an Krebs, so hatte das aus dem Serum des Patienten und der Hypophysenemulsion bestehende Gemisch den Stoffwechsel des Test-Tieres gesteigert. Angenommen, dass die Antihormone für den Krebs bezeichnend sind, standen die überraschend übereinstimmenden Ergebnisse in gewissem Prozentsatz der Fälle mit den klinischen Symptomen

doch nicht im Einklang. Die Ursache dürfte u. a. darin bestehen, dass der Organismus die durch die Geschwulst zustande gebrachten Stoffwechselstörungen durch Dazwischenschaltung zahlreicher kompensierender Mechanismen so lange als möglich auszugleichen versucht. Die Veränderungen lassen sich erst nachweisen, wenn diese Kompensation aufhört. Vor dem Eintreten des Inkompensationszustandes sind die Ergebnisse natürlich schwankend. Es ist aber trotzdem anzunehmen, dass die Antihormonforschung sich als ein gangbarer Weg erweisen wird.

Die von uns in der *zweiten Gruppe* erwähnten Verfasser haben von den der Immunbiologie entnommenen zahlreichen Verfahren in erster Linie die Komplementbindungsreaktion angewandt. Die grösste Schwierigkeit des Verfahrens besteht in der Herstellung eines guten Antigens. Es ist schwer vorstellbar, dass das von den gesunden Zellen des Organismus so abweichende Neoplasma sich in bezug auf den Organismus gänzlich ohne Wirkung vermehren und im Nervensystem keine Spuren hinterlassen oder es nicht in der Weise beeinflussen würde, dass es keine Antikörpererzeugung vermitteln sollte. Und trotzdem sieht man, dass die Resultate, gleich ob die Verfasser Alkohol- oder Azetonextrakte, cholesterinisierte oder lipoidfreie Auszüge gebraucht haben, nicht befriedigend waren (*Hirszfeld* [5], *Hirszfeld* u. *Halber* [6], *Reichner* [15], *Witebsky* u. *Morelli* [24], *Sievers* [20], *Kidd* [7], *Jacobs* u. *Houghton* [8], *Thornton*, *Ellerbrook*, *Rhees*, *Stowell* u. *Lippincott* [22]). *Sümegi* [21] hatte vor Jahren bei der Untersuchung von Ratten-Krebsmaterial bzw. der Wirkung der daraus hergestellten Fraktionen festgestellt, dass die ausdrücklichste Wirkung auf das gesunde Tier die lipoidartigen Auszüge der Trockensubstanz des Tumors ausüben. Die Fettsäuren höherer Ordnung, die nicht gesättigten Fettsäuren niedrigerer Ordnung, die Cholesterinester, das Tumorglyzerin haben Kachexie, Anämie, Hämolyse usw. herbeigeführt. Da man für möglich hielt, dass das wirksame Antigen nicht in den vorhin erwähnten Auszügen, sondern in den lipoidartigen Fraktionen vorhanden ist, hatte *Putnoky* [14] versucht, mit diesen Komplementbindungsreaktionen anzustellen. Er fand, dass die Resultate ohne Zweifel besser waren als die mit den früher erwähnten Extrakten erzielten, doch auch der beste Auszug gab mit sicherem Krebsserum nur in 87% ein positives Ergebnis. Praktisch war demnach auch dieses Verfahren unbrauchbar. *Lehman—Facius* [9] hatte gleichfalls eine spezifisch wirkende Lipoidfraktion aus Tumoren hergestellt, seine Angaben wurden jedoch durch *Morelli* [10] widerlegt. Neuerdings werden von *Hecht* [4] für die aspezifischen Bindungen Lipoide verantwortlich gemacht, und er findet daher zur Durchführung der Komplementbildung mit Äther, Alkohol und Azeton behandelte Geschwulstextrakte für zweckmässiger. *Morelli* [12] hatte aus verschiedenen Geschwülsten Eiweissextrakte bereitet und damit Komplementbindungsreaktionen durchgeführt. Da er aber mit embryonalen Gewebsextrakten zu ähnlichen Resultaten gelangte, mussten die Auszüge ebenfalls als unspezifisch abgelehnt werden.

Narzissow und *Silber* [13] haben von der Virustheorie ausgehend aus Tumoren Nukleoproteidfraktionen hergestellt und für Komplementbindung verwendet. Sie bemerkten aber, dass die spezifische Nukleoproteidfraktion durch normale Gewebsnukleoproteidteile verunreinigt ist. Weitere Reinigungsversuche der Fraktion blieben erfolglos. *Lind* und *Ashley* [11] versuchten, die Kahnsche Universalreaktion zu diesem Zwecke zu verwenden, sie konnten aber keinerlei Spezifizität nachweisen.

Die abweichenden Resultate dürften ihren Grund in der verschiedenen Herstellung der Antigene haben. Es ist ausserdem fast unvorstellbar, dass die in ihrer morphologischen Erscheinung verschiedenen Geschwülste, wie z. B. die zahlreichen Abarten des Karzinoms oder die vielartigen Sarkome, von welchem Organ immer sie ausgehen, die gleiche Wirkung ausüben sollten und auch die Eigenschaften des Antigens die gleichen seien. Bei der Untersuchung des Charakters des Tumorantigens kam *Rous* [19] zu der Feststellung, dass es kein universelles Tumorantigen gebe, sondern dass jede Geschwulstart einen besonderen Antigencharakter besitze, und diese Tatsache sei es, die die Ausgestaltung der serologischen Tumordiagnose so sehr erschwert. Dies beweisen auch die Untersuchungen *Silbers* [25], der die Antigeneigenschaft der Tumoren durch spezifische anaphylaktische Versuche erwiesen hatte. Jedenfalls spielte in den Untersuchungen dasjenige Organ die entscheidende Rolle, von welchem die Geschwulst ausging. In seinem Versuchen fehlen die Angaben, die den Nachweis der von dem Geschwulstorganismus erzeugten spezifischen Antikörper bewiesen hätten.

In früheren Untersuchungen (*Backhausz* u. *Vajda* [1], *Vajda* u. *Backhausz* [23]) fanden wir, dass der Nachweis der Zytotropine ein äusserst empfindliches serologisches Verfahren ist und mit demselben auch kleine, mit sonstigen Verfahren nicht nachweisbare Antikörpermengen (z. B. Rh-Antistoffe, Antispermine) registriert werden können. Wir versuchten nun, diese Empfindlichkeit des zytotropischen Systems in dem Problem, die etwa entstandenen Tumorantikörper nachweisen zu können, uns zunutze zu machen. Falls die Geschwulstzellen tatsächlich aus einem anderen Eiweiss bestehen und dieses im Vergleich mit den Eiweissen des Organismus artfremd ist, so ist anzunehmen, dass auch eine Antikörpererzeugung stattfindet, die nun mit Hilfe des zytotropischen Systems nachweisbar sein dürfte. Bei der Durchsicht der Literatur fanden wir keine diesbezüglichen Untersuchungen.

Methodik

Aus frisch entferntem Operationsmaterial oder Sektionsmaterial an Tumor gestorbener Individuen wurde Tumorgewebe entnommen und daraus eine Zellsuspension bereitet. Die Suspension wurde mit Tumorkrankenserum zusammengebracht, die Zellen dadurch sensibilisiert und dann intraperitoneal

weissen Mäusen eingespritzt. Nach 3 Stunden wurden die Mäuse mit Leuchtgas getötet. Von dem in der Bauchhöhle gebildeten Exsudat wurden Ausstrichpräparate gemacht. Nach Trocknung, Fixierung mit Methylalkohol und Färbung nach *Romanovsky—Giemsa* wurden die von den Leukozyten des Tieres phagozytierten Tumorzellen gezählt und der Prozentsatz der phagozytierenden Leukozyten festgestellt. In jedem Falle wurden 1000 Leukozyten gezählt.

Bei unseren Adsorptionsversuchen haben wir den nach Zentrifugieren gewonnenen Zellniederschlag mit einer gleichen Menge von Immunserum zusammengebracht. Danach wurde 1 Stunde lang stehengelassen und zentrifugiert. Dieser Prozess wurde noch zweimal wiederholt, und das nach der letzten Zentrifugierung erhaltene klare Serum wurde zur zytotropischen Reaktion verwendet.

Die Versuche haben wir in verschiedenen Kombinationen durchgeführt:

a) In der ersten Versuchsreihe wurde die aus der operativ entfernten Geschwulst hergestellte Tumorzellensuspension mit dem Serum des gleichen Patienten zusammengebracht.

b) In der zweiten Versuchsreihe haben wir Serum sicher Geschwulstkranker mit Zellensuspension aus dem Tumor eines anderen Kranken vermischt.

c) In der dritten Versuchsreihe wurde Serum geschwulstkranker Personen mit Suspension von Tumoren anderer Genese untersucht. (Krebskrankenserum mit Sarkomzellen, Sarkomkrankenserum mit Krebszellen.)

d) In der vierten Versuchsreihe haben wir Sera gesunder Personen mit verschiedenen Tumorzellensuspensionen zusammengebracht.

In den obenerwähnten Versuchsreihen haben wir die von 46 Kranken gewonnenen Sera untersucht. Wir konnten in keinem Fall Phagozytose beobachten, obwohl mit den Sera und Zellsuspensionen sämtliche Kombinationen eingestellt wurden. In der letzten »*d*«-Gruppe wurden 10 gesunde Personen mit negativen Ergebnissen untersucht.

Die Versuche zeigen, dass das Serum geschwulstkranker Personen weder auf die eigenen Tumorzellen noch auf die von anderen Kranken stammenden Tumorzellen einen zytotropischen Effekt hatte.

Nachfolgend haben wir Untersuchungen durchgeführt, um die Angaben von *Silber* und die Antigeneigenschaft unserer gebrauchten Zellsuspension zu kontrollieren. Zu diesem Zwecke haben wir mit der erwähnten Leberkrebszellensuspension Kaninchen immunisiert und die zytotropische Eigenschaft ihrer Sera untersucht (Tabelle I).

Es erwies sich, dass das Serum der behandelten Tiere, wenn auch in geringerem Grade, jedoch eine ausgeprägte zytotropische Wirkung besitzt. Bei künstlicher Immunisierung ist demnach der Antigencharakter der Tumorzellen nachweisbar.

Aus dem durch Immunisierung gewonnenen Serum haben wir die für die Tumorzellen nicht spezifischen Stoffe mittels gesunder Leberzellen absorbiert

TABELLE I

Nr.	Tumorzellen-antigen	Immunsera	Phagozytose %	Phagozytose % nach Adsorption
1.	Leberkrebs	Kaninchen	3	—
2.	«	«	3	2
3.	«	«	3	2
4.	«	«	3	—
5.	«	«	4	3
6.	«	«	4	3
7.	«	«	5	—
8.	«	«	5	4
9.	«	«	5	4
10.	«	«	5	—

und den zytotropischen Versuch dann durchgeführt. Nach in dieser Weise stattgefundener Absättigung des Serums nahm die Wirkung desselben gegenüber Tumorzellen um 1% ab, war jedoch noch immer ausgeprägt, was beweist, dass die Tumorzellen tatsächlich ein spezifisches Eiweiss enthalten, das durch die normale Leberzellensuspension nicht absorbiert werden konnte (siehe Tabelle).

In einer weiteren Versuchsreihe haben wir Kaninchen mit gesunden Leberzellen immunisiert. Das auf diese Weise gewonnene Kaninchen-Immunserum zeigte ebenfalls eine zytotropische Wirkung ; im Absättigungsversuch jedoch, nach der Absorption durch Leberzellen, übte das Serum auf die Tumorzellen keinen zytotropischen Effekt aus. Kaninchen erzeugen demnach, wenn die Immunisierung nur mit gesunden Zellen des Tumorträgers stattfindet, gegenüber Geschwulstzellen keine spezifischen Antikörper.

Unsere Versuche mit dem zytotropischen System haben uns noch auf ein wesentliches Moment aufmerksam gemacht, und zwar darauf, dass weisse Mäuse Tumorzellen gegenüber äusserst empfindlich sind. Nach intraperitonealer Impfung ist ein Teil der Tiere nach 2—3 Stunden eingegangen, was zwar auch bei normalen Gewebszellen vorkommen kann, jedoch nicht in dem Masse wie bei den mit Tumorzellen geimpften Tieren. Um die durch das Eingehen der Tiere entstandenen Fehler auszuschalten, haben wir mit jedem zur Untersuchung gelangenden Serum-Tumorzellengemisch 3—4 Mäuse geimpft. Diese Beobachtungen, ferner die mässige Phagozytose, die wir bei den Tumorzellen feststellen konnten, weisen darauf hin, dass die Geschwulstzellen auf weisse Mäuse toxisch wirken. Diese Angaben werden durch die früheren Beobachtungen von *Rosskin* [17], *Rosskin* u. *Nastjukowa* [18], nach welchen das Serum von Krebskranken auf die Vermehrung des Paramecium caudatum eine toxische

Wirkung ausübt, unterstützt. Sie haben diese Erscheinung bei Krebskranken auch als Test verwendet. Ausserdem machten sie die Beobachtung, dass durch Krebsserum die Phagozytosefähigkeit der Zellen herabgesetzt wird. Die Erwägung dieser Angaben und unserer eigenen Befunde lässt annehmen, dass die Erscheinung in der Entstehung der Tumormetastasen eine Rolle spielen dürfte. Die Tumorzellen gehen nämlich, in fremdes Milieu versetzt oder in ein anderes Organ gelangend, durch Phagozytose schwerer zugrunde als die normalen Zellen. Unsere diesbezüglichen Forschungen werden weitergeführt.

ZUSAMMENFASSUNG

Das zytotropische System, in welchem die Antikörper durch Phagozytose der Zellen nachgewiesen werden, zeigte sich in unseren früheren Untersuchungen viel empfindlicher als die sonstigen üblichen serologischen Verfahren. Wir haben von der Empfindlichkeit der Reaktion Gebrauch gemacht und versuchten dadurch die gegen Tumorzellen auftretenden Antikörper nachzuweisen. Das Serum des geschwulsttragenden Organismus zeigte sich jedoch in dieser Hinsicht negativ. Gegen Tumorzellen lässt sich durch parenterale Zufuhr bei einer anderen Tierart eine Antikörpererzeugung ohne Zweifel nachweisen, der Organismus des Tumorträgers selbst aber erzeugt gegen Tumorzellen kein Zytotropin. Der Unterschied zwischen der Antigenstruktur der gesunden und der Geschwulstzellen ist zweifellos vorhanden. Der Organismus des Tumorkranken vermag aber diesen Unterschied gegen die eigenen Zellen serologisch nicht zum Ausdruck zu bringen. Der Unterschied der Antigenstruktur zwischen den beiden Zellentypen kann nur durch mit anderen Tierarten durchgeführte Immunisierungsversuche nachgewiesen werden. Eine frühzeitige Aufstellung der Tumordiagnose ist demnach mit diesem serologischen Verfahren nicht möglich.

LITERATUR

1. *Backhausz, R.* u. *Vajda, Gy.:* Kísérletes Orvostudomány Nr. 2. (1951).
Backhausz, R. u. *Vajda, Gy.:* Zschr. f. Immunitätsforsch. **110.** 41, (1953).
2. *Doerr, R.:* Die Antigene. Bd. III. 1948.
3. *Eitel, H.:* Klin. Wschr. S. 1467, (1938).
4. *Hecht, H.:* Schweiz. Med. Wschr. 1058, (1952).
5. *Hirszfeld, L.:* Zschr. f. Immunitätsforsch. **64**, 1929.
6. *Hirszfeld, L.* u. *Halber, W.:* Zschr. f. Immunitätsforsch. **75**, 193, (1932).
7. *Kidd, J. G.:* J. exp. Med. **71**, 355, 1942.
8. *Jacobs, J. L.* u. *Houghton, J. D:* Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. **47**, 1941.
9. *Lehman—Facius, H.:* Zschr. f. Immunitätsforsch. **82**, 91, (1934).
10. *Morelli, E.:* Zschr. f. Immunitätsforsch. **83**, (1934).
11. *Lind, H. E.* u. *Ashley, O.:* Cancer, 406 (1952).
12. *Maculla, E. S.:* Falc. J. exp. Med. 20, (1948).
13. *Нарцissов, Н. и Зильбер, Л. А.:* С. С. С. Р. Лив. 229, (1949).
14. *Putnoky, Gy.:* Ung. Pathol. Ges. S. 24, (1933).
15. *Reichner:* Zit. *Silber*, Szov. Orvostud. Ref. Szemle (1951).
16. *Rhodewald, W.:* Dtsch. Med. Wschr. 726, 1936. 1271, (1937) Zschr. f. Krebsforsch. **47**, 540, (1938).
17. *Rosskin, G. I.:* Bull. exp. Biol. Med. **62**, 1—2, 17, (1944).
18. *Rosskin, G. I.* u. *Nastjukova, O. K.:* Bull. exp. Biol. Med. **16**, 6, 5, (1942).
19. *Rous, P.:* Recent Adv. in Canc. Res. M. R. Acad. of Med. Bd. **23**, Nr. 2. S. 65, (1947).
20. *Sievers, O.:* Zschr. f. Immunitätsforsch. **41**, 307, (1934).
21. *Sümegi, S.:* Zbl. f. Path. 6/9, 268, (1938); Frankf. Zschr. f. Path. **48**, 386, (1935); Ung. Pathol. Ges. 1933. (1941); Z. Beitr. Path. Anat. **92**, 210, (1933).

22. *Thornton, H., Ellerbrook, L. D., Rhees, M. C., Stowell, E. C. Jr.* u. *Lippincott, S. W.*: J. Nat. Cancer Inst. **11**, 97 (1950).
23. *Vajda, J.* u. *Backhaus, R.*: Kísérletes Orvostudomány Nr. 4. (1952).
24. *Witebsky, E.* u. *Morelli, E.*: E: Z. chr. f. Immun tätsforsch. **78**, 179, (1933).
25. *Зильдер, Л. А.*: Успехи Современной Биологий XXX. 2. 188 (1950).

ЦИТОТРОПНОЕ ДЕЙСТВИЕ НА ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

Дь. Вайда, Л. Горецки, И. Рот и И. Шюмеги

Резюме

Цитотропная система — при которой определение антител производится с учетом фатоцитоза клеток — в наших предыдущих опытах оказалась гораздо чувствительней обычных серологических методов. Используя чувствительность реакции, мы пытались обнаружить присутствие антител к опухолевым клеткам, однако в сыворотке опухолевого организма наличия антител обнаруживать не удалось. Парентеральным введением антигена животным других пород безусловно можно определить появление антител к опухолевым клеткам, но сам опухолевый организм к собственным опухолевым клеткам цитотропина не производит. Без сомнения имеется разница между структурами антигенов здоровых и опухолевых клеток. Организм страдающих опухолевыми заболеваниями серологически неспособен выразить этой разницы по отношению к собственным клеткам. Разница между структурами этих двух типов клеток может быть определена только в опытах иммунизации животных других пород. Своевременная поставка диагноза опухоли таким серологическим методом не увенчалась успехом.

PURIFICATION OF DIPHTHERIA AND TETANUS TOXOIDS BY TRICHLORACETIC ACID

I. PURIFICATION OF DIPHTHERIA TOXOID

By
M. SURJÁN and P. RICHTER

»Human« Institute for Production and Research of Serobacteriological Preparations, Budapest

Received July 31, 1953

Endeavours to achieve the purification of diphtheria antigens reach back to the discovery of toxins [1].

Purification has served, from the beginning, the dual purpose of establishing the exact chemical and serological nature of antigens and to decrease the reaction developing in consequence of their application.

During the last 60 years numerous reports have dealt with the purification of diphtheria toxin and toxoid. Most of the methods proposed involved, however, an expensive equipment and excessive loss of time or else they did not achieve a high degree of purification. This is why their use did not become widespread in practice.

There are two reasons why despite these difficulties the purification of toxoid still deserves attention.

(i) The world-wide increase in the morbidity rate of diphtheria in adults [2].

(ii) The ever increasing demand for combined prophylactic inoculations.

With the increase in the morbidity rate of diphtheria in the adult age group, immunization of older subjects became necessary [3]. This presents many problems since, parallel with age, reactions become more frequent and more intensive due to the prevalence in adults of hypersensitivity to diphtheria toxoid. According to literary data, immunization of susceptible adults without severe reactions can be realized only by purified toxoid [4].

Purification is indispensable for the preparation of combined antigens because toxoids produced on enzyme hydrolyzed media do not always contain the high antigen value necessary on account of the dilution ensuing at combination. The high Lf value needed for the combination can only be ensured on synthetic media. Large-scale production of this kind of media is not easily realizable because of the high costs involved.

A great advantage of purified antigen is that immunization of horses with purified toxoids may yield more potent antitoxins with less ill-effect on the animals.

The usual procedures for purificating diphtheria toxin may be divided into 5 groups.

(i) Neutral salt precipitation and fractionation with ammonium sulfate [1,2]; (ii) adsorption on $Al(OH)_3$ gel [5]; (iii) purification by trichloracetic acid [6, 7, 8]; (iv) precipitation with organic solvents, such as acetone, ethyl alcohol, methyl alcohol [9, 10, 11]; (v) ultrafiltration [12].

Two different ways can be adopted for the procedure of purification; either the toxin itself may be purified or else the toxoid. The toxoid is more difficult to purify because the porphyrines become fixed by formaldehyde. On the other hand, purified toxins are not sufficiently stable, their purification involves higher losses in antigen and detoxication exacts great care. Taking all these facts into consideration, we have adopted the method of purifying the toxoid.

In practice the choice of the method is decisively determined by the simplicity of the procedure and the degree of the yield. The postulate for a method of purification suitable for large scale production is an 80 per cent yield. Our task consisted in elaborating a method of purification adequate from the practical point of view. Therefore we have chosen the trichloracetic acid method of *Boivin* and *Izard*, and started our experiments on the basis of *Amoureux* and *Yen's* studies [8].

Methods

Crude toxoid. A filtrate of the converted toxoid of the diphtheria strain PW8 produced on Pope's [16] or Linggood's media [1] was used.

Reagents. Trichloracetic acid: 163,5 g CCl_3COOH were dissolved in distilled water and diluted to 1 litre.

Phosphate buffer. Solution A, M/15 KH_2PO_4; solution B, M/15 Na_2HPO_4. To obtain 1 litre of phosphate buffer of pH 8, 55 ml of solution A were mixed with 945 ml of solution B. Determination of pH was made by means of an electric pH apparatus with a glass electrode.

Innocuity test. Guinea pigs inoculated subcutaneously with a five-fold human dose were observed for 6 weeks for local and general symptoms.

Anaphylaxis test. 1 ml of precipitated toxoid was administered to guinea pigs. After 6 weeks the animals were challenged with 0,5 ml of horse or cattle serum given intracardially and were then held under observation for 3 hours.

Standardization. The flocculation value (Lf) was determined by the Ramon technique in a water bath of 45°C. For the determination of flocculation time the purified toxoids were diluted with a NaCl solution; those produced in Pope's medium up to 25 Lf and those produced in Linggood's medium up to 50 Lf and standardization was repeated with the same standard serum that had been used for the crude toxoid.

Immunity test was made with a precipitated toxoid containing 30 Lf per ml. Adsorption was performed according to *Ericsson's* method [7], on $AlPO_4$ gel. 7 guinea pigs were inoculated with each sample; each animal was given 1 ml of the precipitate subcutaneously. 5 weeks after inoculation the animals were bled by puncturing the heart and the pooled sera were titrated. Standardization was for the most part effected at the Serum Department of our Institute by means of *Jensen's* intracutaneous rabbit method [18].

Nitrogen was determined according to *Kjeldahl*, in *Schulek—Vastagh's* distilling apparatus. All determinations were made in triplicate. Purity was determined by reckoning the Lf value per mg of N of the original toxoid and ascertaining the Lf also per mg of N of the toxoid in question. The purity factor is expressed by the ratio,

$$\text{Purity factor} = \frac{\text{Lf per mg of N purified toxoid}}{\text{Lf per mg of N original toxoid}}$$

Not in one single case did we observe anaphylaxis to native serum, irrespective whether the purified toxoids had been produced on *Pope*'s or on *Linggood*'s medium.

In the immunization tests the antitoxic titre of guinea pigs showed great individual fluctuations. The procedure is at most suitable for demonstrating great difference between single antigens. Hence no far-reaching conclusions can be drawn from the investigations, we may only establish that the antigen value of the toxoids was not considerably impaired in the process of purification. The pooled serum of guinea pigs, immunized as described above, contained 2 U per ml on the average.

Discussion

It may be stated that toxoids produced either on *Pope*'s or on *Linggood*'s media can satisfactorily be purified at pH 4 by trichloracetic acid.

The mean flocculation time of purified toxoid diluted with isotonic NaCl tallies with that of crude toxoid. It was observed that dilution with a phosphate buffer results in a Kf markedly shorter than the original. Hence the assertion that the shortening of flocculation time — in the case of dilution with phosphate buffer, — should signify an increase of the antigenic effect, must be accepted with reservation.

According to the data available, the following results have been achieved with trichloracetic acid by foreign authors (Table IV). *Ericsson* obtained on

TABLE IV

Comparison of our results with the data of foreign authors

Author	Medium	Crude toxoid Lf/mg N	Precipitation pH	Purified toxoid Lf/mg N
Ericsson	Philippe-Loiseau	8	3—3,5	250
Amoureux, Yen	unpublished	5—10	4	250—300
Surján—Richter	Pope	5	4	300
Surján—Richter	Linggood	16	4	550

Philippe-Loiseau's medium by means of precipitation at pH 3—3,5 a material of 250 Lf per mg of N purity. With the aluminium phosphate adsorption described by him, a 98 per cent Schick negativity was obtained with a toxoid of 50 Lf per ml. *Amoureux* and *Yen* achieved a purity of 250 to 300 Lf per mg of N with precipitation at pH 4 after preliminary purification with charcoal, kaoline and acetone. They found the antigenic effect equal to that of crude toxoid.

The considerably higher purity described in the literature was achieved on synthetic culture media with the combination of several purification procedures, in general with a much poorer yield.

SUMMARY

Diphtheria toxoids produced on *Pope*'s and *Linggood*'s media were purified by applying *Boivin—Izard*'s procedure. The toxoid was precipitated at pH 4 and immediately centrifuged on a supercentrifuge. The precipitate was diluted with a phosphate buffer, preserved with Na-ethylmercury- thio- salicylate and filtered through a Seitz filter. In large scale production an average yield of 80 per cent was obtained. Purity was 300 and 550 Lf per mg of N respectively, depending on the toxoid having been produced on Pope's or Linggood's medium. The mean flocculation time tallied with that of the crude toxoid, provided the concentrated material was diluted with 0,85 per cent NaCl. Diluting with phosphate buffer made the flocculation time markedly shorter. The purified toxoid was adsorbed on $AlPO_4$. The antigen content of the precipitated preparation amounted to Lf per ml. The pooled serum of guinea pigs immunized with 1 ml toxoid contained 2 U per ml on the average. Guinea pigs inoculated with 5 ml of the precipitate developed no anaphylaxis after intracardial administration of horse or cattle serum.

The method presented is rapid and simple and by its means daily 100 litres of toxoid may be purified in a single laboratory size Sharples centrifuge.

II. PURIFICATION OF TETANUS TOXOID

BY M. SURJÁN, P. RICHTER AND L. RÉTHY

The decrease of inoculation reactions, the increase of the antigen content, the preparation of combined antigens and the elimination of anaphylactogenic phenomena require the purification not only of diphtheria toxoid but also of the tetanus one.

The increase in the antigen content assumes a special importance with tetanus toxoid. Although non-concentrated toxoid may, according to *Erdős* [19], give rise to an immunity of 97 per cent, the production of an even more potent antigen would be desirable, in order to minimize the necessity of serum prophylaxis, with all its harmful effects [19]. Therefore our preparations must contain 12 antigen units in place of the former 2,5 to 5 antigen units. Most of the toxoids produced on Taylor's medium do, however, not attain this combining capacity.

For purification of tetanus toxoid essentially the same chemical and physical procedures may be taken into condiseration as with diphtheria toxoid. In the light of recent data, three methods seem suitable for large scale production.

(i) *Pillemer* et al. purification with methyl alcohol [20].

(ii) *Levine* and *Stone*'s neutral salt precipitation and fractionation with ammonium sulfate [21].

(iii) *Amoureux* and *Yen*'s and *Jacobs* and *Behan*'s, purification with trichloracetic acid [8, 22, 23].

Purification with trichloracetic acid was chosen, all the more so as we had employed this method with good results in the purification of diphtheria toxoid, and also because in the light of the above literary data we considered the method most suitable for practical purposes. Our task consisted in adapting this procedure to our own culture media and to the prevailing culture conditions.

Procedure of purification. A sample of 100 ml is taken from 10 litres of diphtheria toxoid and the amount of trichloracetic acid necessary for adjusting the whole 10 litres to pH 4 is ascertained. This quantity is added to the toxoid under continuous shaking. The pH is controlled, the flocculated precipitate immediately centrifuged on a laboratory size Sharples centrifuge at 35.000 rpm. The precipitate is dissolved in 200 ml phosphate buffer and preserved with Na-ethylmercury-thio-salicylate 1 : 10,000. A sizable quantity is collected, filtered through a Seitzfilter and a sterility test is performed.

Results

Owing to the contradictory literary data we had to perform experiments in order to determine the optimum pH of the precipitation (Table I). The materials listed in the table were diluted to the original volume. The experiments were begun with diphtheria toxoid produced on *Pope*'s medium.

TABLE I

Precipitation at varying pH of toxoid produced on Pope's medium

Crude toxoid					Purified toxoid				
Lot No.	Lf/ml	Kf	Lf/mg N	Precipitation pH	Lf/ml	Kf	Lf/mg N	Yield %	Purity
109/V	27,4	25′	4,93	3,0	24	35′	204	87,5	43,5
				3,5	23	30′	234	83,9	47,5
				4,0	24	26′	298	87,5	61
111/E	27	26′	5,1	3,0	26	36′	209	85,2	41
				3,5	25	30′	255	92,5	50
				4,0	24	26′	299	88,7	58,6
111/D	26	28′	4,9	3,0	23	35′	235	89,2	48
				3,5	24	29′	258	92,8	52,5
				4,0	23	29′	308	89,2	63

In serial experiments it was found that while at pH 3 the material was of a purity of 210 Lf per mg of N, at pH 3,5 it was 250 Lf per mg of N and at pH 4 300 Lf per mg of N. Simultaneously with the increase of the pH, a favourable change occurred in the flocculation time which at pH 4 showed an analogous value to that of the crude toxoid. A further advantage of precipitating at pH 4 is that the toxoid obtained has a lighter colour.

The experiments were then continued at pH 4. Subsequent to precipitation and centrifugation the dissolved toxoid was further diluted either with isotonic NaCl solution, or with a fifteenth molar phosphate buffer of pH 7. An interesting observation was made as to the flocculation time with the two kinds of dilution.

After dilution with phosphate a shorter Kf (Table II), and in some cases a higher Lf value than the true one was obtained ; this was shown by the yields exceeding 100 per cent after purification. It should also be mentioned that a considerably longer Kf is obtained if owing to technical reasons the precipitate cannot be immediately centrifuged.

TABLE II

Precipitation at pH 4 of toxoid produced on Pope's medium. Comparison of the flocculation time in the case of phosphate buffer and isotonic NaCl dilutions

Crude toxoid			Purified toxoid		
Lot No.	Lf/ml	Kf	Lf/ml	Kf	
				(phosphate)	(isotonic NaCl)
109/V	27,4	25′	25	5′	28'
111/E	27	28′	25	8′	29′
111'D	26	28′	25	8′	26′
109/E	26	28′	25	9′	25′

Next we shall discuss precipitation at pH 4 of toxoid produced on Linggood's medium. On this medium results in respect to purity were even more favourable, — the average purity of materials was 550 Lf per mg of N (Table III). The purity

TABLE III

Precipitation at pH 4 of toxoid produced on Linggood's medium

Grude toxodi					Purified toxoid				
Lot No.	Vol. litre	Lf/ml	Kf	Lf/mg N	Lf/ml	Kf	Lf/mg N	Yield %	Purity
4/A	100	52	10′	16,6	42	15′	500	80,8	30
11/9	100	42	53′	15	39	65′	616	92,8	41
13/A	100	37	60′	16,1	35	35′	590	94	36,6
13/B	100	39	103′	16	33	90′	478	85	31,9
14/A	100	42	43′	16,1	33	42′	552	76,5	34,1
1/A	0, 2	50	16′	16	49	6′	700	98	30

data tabulated in the first five lines refer to large quantities. In experimental amounts (bottom line) the flocculation time is markedly shorter and the yield greater, because under such conditions the toxoid must be maintained at a low pH only for a few minutes and the precipitate can be recovered without loss from a single centrifuge cup. This is naturally not feasible in large scale production.

The purified toxoids proved innocuous in all the cases. Guinea pigs tolerated even a 50-fold human dose.

Methods

Preparations of the reagents employed, measurement of the pH, determination of nitrogen and of the degree of purity, further innocuity and anaphylaxis tests were carried out in the way described in the first part of this paper.

Crude toxoid. Tetanus toxin was produced from the Harvard strain of Clostridium tetani on Taylor's medium [24], with an incubation time of ten days. 0,3 per cent formaldehyde was used for detoxicating the fresh toxin and the materials were maintained at 37°C for four weeks.

Flocculation. In standardization, the introduction of Ramon's flocculation test [25] presented a special problem. This procedure is not generally used in the standardization of tetanus toxin, owing to the fact that beside the specific toxin-antitoxin precipitation, paradox flocculation is frequently produced also by the bacillary antigens and the corresponding antibodies.

Since Ramon several techniques have been proposed for the elimination of paradox flocculation and zone phenomena. One of the possibilities is to use an adequately purified flocculating serum. In our Institute we attempted to perform flocculation with a rapidly flocculating tetanus serum containing no bacterial antibodies, purified by proteolytic digestion and neutral salt precipitation with ammonium sulfate. Flocculation was carried out according to the Ramon technique in a water bath of 45°C, at pH 7,4. The antitoxin was diluted with isotonic NaCl so as to contain 100 U per ml.

Combining power was determined with *Bächer*, *Kraus* and *Loewenstein's* method [26], establishing the amount of toxoid necessary for binding 1 antitoxic unit to such a degree that the effect of the toxoid should not be influenced by toxin added to it 4 hours later.

Immunization test. Guinea pigs are inoculated subcutaneously with 1 ml of a toxoid adsorbed on $AlPO_4$ containing 5 units [11]. Five weeks after inoculation the pooled serum of at least 4 guinea pigs is titrated in mice against an international standard serum. The serum of the immunized guinea pigs should contain at least 1 IU per ml.

Process of purification. A 100 ml sample is taken from 50 l of tetanus toxoid and from this the amount of normal trichloracetic acid necessary to bring the 50 litres to pH 3 is determined. This amount is added to the toxoid under continuous shaking. After controlling the pH we wait one half hour until a fine precipitate has appeared. The material is then centrifuged in a laboratory size Sharples centrifuge at 35.000 rpm. The precipitate is dissolved in 500 ml of M/15 phosphate buffer of pH 8, adding Na-ethylmercury-thio-salicylate 1 : 10 000 as a preservative. The purified toxoid is filtered through a Seitz filter and tested for sterility and innocuity.

Results

The procedure of purification chosen had to be modified according to the culture medium, the culture conditions and the antigen content of the toxoid. The modification consisted in adjusting the precipitation pH. Despite the fact that with diphtheria toxoid at pH 4 an almost colourless, rapidly flocculating and considerably purer antigen could be obtained than at pH 3, in the purification of tetanus results could be achieved only at pH 3. Our tetanus toxoids gave no precipitation at pH 4, even after prolonged standing.

A few purification data are listed in Table V. From these it may be ascertained that with a 67 to 100 per cent yield an antigen of a purity of 250 to 940 Lf per mg of N was obtained.

Our purified toxoids are in general well flocculable. Results of flocculation shall not be discussed in detail. It should suffice to mention that in the majority

of instances they tally surprisingly well with the combining capacity (see Table V). Though zone phenomena were not observed, paradox flocculation occurred in a few cases. In part of the cases the flocculation value was higher by some per-

TABLE V

Purification of tetanus toxoid with trichloracetic acid

Crude toxoid					Purified toxoid*				
Lot No.	Combining unit/ml	Lf/ml	Kf	Lf/mg N	Combining unit/ml	Lf/ml	Kf	Lf/mg N	Yield %
11/a	6	6	110	2,0	8	8	180	258	67
11/b	5	7	123	2,0	11	13	154	250	93
11/c	6	6	94	2,0	9	9	150	300	75
11/d	11	12	82	3,5	19	20	62	530	83
12/a	6	8	65	3,0	9	12	110	320	75
12/b	10	12	160	3,5	18	22	90	412	92
12/c	14	14	81	4,0	28	28	130	940	100

*The volume of the purified toxoid is half the volume of the crude toxoid.

cents than the combining power even when flocculation was effected with several purified sera. Consequently flocculation was introduced only for experimental purposes, for rapid orientation, but for precipitated toxoids it is the combining power which is always taken as basis.

The flocculation time (Kf) showed considerable variations. Under identical conditions, in part of the cases we obtained a shortened Kf value, while in the rest a considerably lengthened one. Further investigations are needed for clarifying this point.

In the innocuity tests the guinea pigs inoculated with a fifty-fold human dose remained symptom-free. In the treated guinea pigs no anaphylaxis could be elicited with native serum.

Immunization tests were conducted with 20 lots. Purified toxoids adsorbed on $AlPO_4$ proved to possess good antigenic properties, insofar as all the 20 lots yielded an antitoxic titre of 2 U per ml or even higher, 6 of the lots yielding a titre of 8 U or more per ml. 2 of the latter 6 lots were combined with diphtheria, containing 5 units of tetanus toxoid and 30 Lf diphtheria toxoid in 1 ml $AlPO_4$ precipitate.

Levine and *Stone* [21] reported the immunizing value of their 33 lots purified with ammonium sulfate and adsorbed on $AlPO_4$. Among these only one yielded an antitoxic titre of 8 U per ml and the repartition of the values of their other lots was also less favourable than that of our preparations.

Discussion

It may be established from the above that the antigenic value of our toxoids was not impaired during the process of purification. The favourable comparison with the data of *Levine* and *Stone* cannot be fully evaluated, because these authors used a different strain of guinea pigs, their toxoids contained 11 Lf while ours contained 5 combining units, all their preparations were combined antigens, whereas only two of ours were combined. The conclusion may, however, be drawn from the comparison that trichloracetic acid does not impair the antigenic effect.

Amoureux and *Yen* [8] obtained by trichloracetic acid purification a purity of from 300 to 500 toxoid units per mg of N. *Jacobs* achieved with a single trichloracetic acid precipitation a purity of from 470 to 1700 Lf per mg of N, depending on whether he had departed from a crude toxoid of 15 or of one of 30 Lf/ml. For obtaining an equally high purity, the production of a high-value tetanus toxoid seems necessary. Experiments in this direction are in progress.

SUMMARY

Tetanus toxoid produced on Taylor's broth was purified with precipitation by trichloracetic acid at pH 3. With one single precipitation a purity of 250 to 940 Lf per mg of N was obtained, with a 67 to 100 per cent yield. For the sake of comparison with literary data and for rapid quantitative evaluation, flocculation was introduced, but because of the paradox flocculation which has presented itself in some cases the antigenic value of our preparations is always given in combining units. As a result of the experiments, since December, 1951, only purified tetanus toxoid precipitates have been prepared in this Institute. These preparations do not sensitize against native sera ; according to quantitative tests made on guinea pigs, they give rise to an antitoxic titre of 2 to 8 U/ml and are suitable for the preparation of combined antigens.

REFERENCES

1. *Roux, E., Yersin, A.:* Ann. Inst. Pasteur **3**, 273 (1889).
2. *Levine, L., Wyman, L.* and *Edsall, G.:* J. Immunol. **63**, 219 (1949).
3. *Lukács, J.:* Congress of Paediatrics, Szeged, 1952.
4. *Ross, V.:* J. Immunol. **63**, 183 (1949).
5. *Schmidt, S., Hansen, A.:* Acta Path. et Microbiol. Scand. Suppl. XVI. 933.
6. *Boivin, A., Izard, Y.:* R. Soc. Biol. **124**, 25 (1937).
7. *Ericsson, H.:* Nature **158**, 350 (1946).
8. *Amoureux, G.* and *Yen, F.:* Ann. Inst. Pasteur **79/6.** 913 (1950).
9. *Wadsworth, A. B., Quigley, J. J., Sickles, H. J.:* J. Immunol. **25.** 130 (1937).
10. *Schmidt, S., Hansen, A.* and *Kjaer, K. A.:* Ann. Inst. Pasteur **46**, 211
11. *Pillemer, L., Toll, D., Badger, S. J.:* J. Biol. Chem. **170**, 571 (1947).
12. *Zajdel, R.:* C. R. Soc. Biol. **113**, 1029 (1932).
13. *Pillemer, L.:* J. Immunol. **53**, 237 (1946).
14. *Holt, L. B.:* Brit. J. Exp. Path. **29**, 335 (1948).
15. *Ujhelyi, K.:* Congress of Paediatrics, Szeged, 1952.
16. *Pope, C. G.:* J. Path. Bact. **35**, II. 573 (1952).
17. *Linggood, F. V.* and *Fenton, E. L.:* Brit. J. Exp. Path. **28**, 354 (1947).
18. *Jensen, Cl.:* Die intrakutane Kaninchenmenthode, Levin & Munksgaard, Copenhague, 1933.

19. *Erdős, L.:* Congress of Paediatrics Szeged, 1952.
20. *Pillemer, L., Wittler, R., Burrel, J., Grossberg, B.:* Jour. Exp. Med., **88**, 205 (1948).
21. *Levine, L.* and *Stone, J.:* J. Immunol. **67**, 235 (1951).
22. *Jacobs, M. B.* and *Behan, M. A.:* J. Am. Pharm. Ass. **39**, 466 (1950).
23. *Jacobs, M. B.: ibid.* 469.
24. *Taylor, E.:* J. Immunol. **50**, 385 (1945).
25. *Ramon, G.:* C. R. Soc. biol. **127**, 1163 (1938).
26. *Bächer, St., Kraus, R.* and *Loewenstein, E.:* Ztschr. f. Immunforsch. **45**, 86 (1925).

ОЧИСТКА ДИФТЕРИЙНОГО И СТОЛБНЯЧНОГО АНАТОКСИНА ТРИХЛОРУКСУСНОЙ КИСЛОТОЙ

Сообщение I

М. Шурьян и П. Рихтер

Резюме

Для очистки дифтерийного анатоксина, произведённого на средах Поп и Лингуд, нами применялся трихлоруксусный метод Боавен—Изарда. Анатоксин на pH 4 осаждались нормальной трихлоруксусной кислотой при комнатной температуре и немедленно центрифугировались суперцентрифугом. Осадок растворялся в фосфатном буфере (pH 8), консервировался мертиолатом и фильтрировался фильтром Зейтца. Очищенный анатоксин по методу Эриксона адсорбировался фосфатом алюминия. Выход в среднем составляло 80%. Чистота 300, или 500 Lf/mg N, в зависимости от того, где производился анатоксин (на среде Поп или Лингуд). Время флокуляции очищенного анатоксина, в среднем, сходилось со временем флокуляции сырого, при разбавлении концентрата 0,85%-ным NaCl. В случае разбавления фосфатным буфером время флокуляции значительно укорачивается, но встречается и парадоксальная флокуляция. Смешанная сыворотка морских свинок, иммунизированных осадочной вакциной в количестве 1 мл. с содержанием анатоксина 30 Lf/mgS, в среднем содержала 2 AE/mS. Данный метод является очень простым и быстрым. С помощью одной лабораторной суперцентрифуги имеется возможность очистки 100—150 литров анатоксина ежедневно.

Сообщение II

Л. Шурьян, П. Рихтер и Л. Рети

Произведенный на среде Тейлора столбнячный анатоксин очищался нами трихлоруксусным методом Боавен—Изарда. Анатоксин на pH 3 осаждался нормальной трихлоруксусной кислотой и после получасового стояния центрифугировался лабораторной суперцентрифугой с числом оборотов в 35.000/мин. Осадок растворялся фосфатным буфером (pH 8), консервировался мертиолатом в разведении 1 : 10.000, фильтрировался фильтром Зейтца и адсорбировался фосфатом алюминия. Для оценки значительности очищенного нами анатоксина, мы проводили флокуляцию, но, ввиду редких случаев парадоксальной флокуляции, антигенная активность вакцин приводится всегда в единицах связывания. Единственным осаждением можно получить анатоксин чистотой в 250—940 Lf/mg N при 60—100%-ном выходе. Проверку иммуногенной активности 20 препаратов мы производили осадочной вакциной, содержащей 5 связывающих единиц. Титр анатоксина смешанных сывороток морских свинок в большинстве случаев превышал 2 JE/ml. Очистка анатоксина трихлоруксусной кислотой состоит из единственного осаждения и поэтому просто и быстро может производиться и в промышленных условиях. Очищенный нами анатоксин годен для изготовления комбинированных вакцин.

WERTMESSUNG AGGLUTINIERENDER IMMUNSERA MIT DER FILTRIERPAPIERMETHODE

Von
GY. VAJDA und R. BACKHAUSZ

Laboratorium des MÁV-Krankenhauses und »Human« Institut für Produktion und Forschung serobakteriologischer Präparate

Eingegangen am 28. August 1953

Die Wertbestimmung der antibakteriellen Immunsera erfolgt im allgemeinen mit Hilfe der Agglutination ; in bestimmten Fällen, so z. B. bei der Untersuchung von Sera mit niedrigem Titer oder von schwer agglutinierbaren Bakterienstämmen, ist die Anwendung von empfindlicheren Untersuchungsmethoden erforderlich.

Im folgenden geben wir die Ergebnisse eines solchen empfindlichen Verfahrens bekannt, welches auf dem Steigen der Bakterien im Kapillarsystem (auf Filtrierpapierstreifen) beruht.

Der erste Forscher, welcher sich mit dem Steigen der Bakterien im Kapillarsystem befasste, war *Friedberger* [1]. Bei seinem Versuch liess er einen 1 cm breiten und 10 cm langen Filtrierpapierstreifen in die zu untersuchende Bakteriensuspension hineinhängen ; nach 10 Minuten erfolgte ein Anstieg der Bakterien in den Kapillaren des Filtrierpapiers bis zu einer gewissen Höhe. Friedberger bestimmte die Anstiegshöhe, indem er von dem Filtrierpapierstreifen auf einer Agarplatte einen Abdruck anfertigte und anschliessend die Agarplatte 24 Stunden lang in einem Thermostat bei einer Temperatur von 37° C unterbrachte ; die Anstiegshöhe auf dem Filtrierpapier wurde von den auf dem Nährboden entwickelten Bakterienkulturen angezeigt. Aus zahlreichen Versuchen zog Friedberger die folgenden Konklusionen :

1. Die Höhe des Kapillaranstieges ist in grossem Masse von der Qualität des Filtrierpapiers abhängig.

2. Gramnegative Bakterien weisen bei gleichen Verhältnissen einen höheren Anstieg auf als grampositive.

3. Die Salmonella typhosa steigt höher als die Escherichia coli. *Friedberger* und *Putter* [2[benützten dieses Phänomen für eine Separation der beiden Bakterienarten. Ihren Angaben gemäss, welche neuestens auch von *Scott* und *Treadwell* [3] bekräftigt wurden, genügt ein einziges Endo-Plättchen zur Bestätigung der S. typhosa.

Nach *Putter* und *Greifswald* [4] ist der Kapillaranstieg nicht von der Motilität, sondern von den Adsorptionseigenschaften der Bakterien abhängig. Desgleichen hängt auch die Gramfärbung mit den Adsorptionseigenschaften zusammen. Es folgt hieraus, dass die kleinere Steigung der grampositiven Bakterien den gramnegativen gegenüber auf die stärkere Adsorption der grampositiven Bakterien zurückzuführen ist. Das Steigen der Bakterien im Kapillarsystem lässt sich laut *Klinger* [5] nicht ausschliesslich durch elektrochemische Faktoren erklären. Auch unserer Ansicht nach kommt eine spezielle Adsorptionserscheinung bei dem Entstehen des Phänomens zur Geltung ; je stabiler die Suspension, um so grösser der Kapillaranstieg auf dem Filtrierpapier.

In Ungarn befasste sich als erster *Szathmáry* [7] mit dem Kapillaranstieg der Bakterien. Er stellte fest, dass ein in Schwemmwasser gezüchteter, apathogener, säurebildender Vibriostamm nach 24—31mal erfolgter Passage an humaner Darmschleimhaut einen um 8—12 mm kleineren Anstieg aufweist als ein Stamm, welcher keiner Passage unterworfen war.

Von besonderem Wert waren die Beobachtungen *Hofmanns* [6], nach denen eine vorangehende Beimengung eines Serums agglutinierender Wirkung zu der Bakteriensuspension, einen geringeren Anstieg der Bakterien auf dem Filtrierpapier ergibt. Diese Hemmwirkung des

Serums kommt bei dem Agglutinations-Endtiter auch im Falle stärkerer Verdünnung zur Geltung. Unter Verwendung des von den Immunsera auf den Kapillaranstieg ausgeübten Hemmeffektes arbeitete *Vajda* [8] im Jahre 1943 ein neues serologisches Verfahren aus, mit dessen Hilfe die einzelnen Glieder der Salmonellagruppe voneinander separiert werden konnten. Dieses Verfahren wurde im Jahre 1950 von *Castaneda* [9] zum Nachweis der Abwehrstoffe gegen die Brucella-Abortus-Stämme mit Erfolg angewandt. Er führte eine Änderung der Originalmethode durch, indem er die zu untersuchenden Bakterien erst mit Eisenhämatoxylin färbte; auf diese Weise kann der Anstieg auf dem Filtrierpapierstreifen ohne Anfertigung eines Nährbodenabdruckes abgelesen werden. Die von Castaneda erzielten Ergebnisse wurden von *Hess* und *Roepke* [10] bestätigt.

Nachdem die von Vajda beschriebene Methode bei den von uns durchgeführten Untersuchungen innerhalb der Salmonella-Gruppe recht aussichtsreiche Ergebnisse zeitigte, entschlossen wir uns zu einer Ausbreitung der Versuche, erst auf andere Darmbakterien und alsdann auf grampositive Kokken.

Methode

Aus dem zu untersuchenden Serum stellten wir entsprechende Verdünnungen her und füllten je 10 ml in sterile Petri-Schalen; den Serumverdünnungen gaben wir je ml in gleichen Mengen 500 Millionen lebende Bakterien enthaltende Suspensionen bei. Zu Kontrollzwecken füllten wir in die letzte Petri-Schale der Reihe bloss physiologische Kochsalzlösung, welcher wir die Bakteriensuspension zusetzten. In die auf diese Weise bereitete Mischung liessen wir 20 Minuten ein Filtrierpapier von 2 cm Breite und 20 cm Länge 0,5 cm tief hineinhängen. Nun schnitten wir das in die Suspension reichende 0,5 cm lange Ende des Filtrierpapierstreifens ab und fertigten von jedem einzelnen Streifen einen Abdruck auf dem in einer entsprechend dimensionierten Cholera-Schale eingefüllten Nährboden an. Die Agarplatten legten wir alsdann für 24 Stunden in einen Thermostat von 37° C. Das Emporsteigen der Bakterien auf dem Filtrierpapierstreifen kann auf Grund der ausgewachsenen Kulturen festgestellt und in Zentimeter ausgedrückt werden.

Man erreicht eine Sensibilisierung der Methode, indem man die Mischung der verdünnten Sera und der Bakteriensuspension für 2 Stunden in einen Thermostat von 37° C legt, sodann 24 Stunden lang auf Zimmertemperatur hält und erst hiernach mit der Untersuchung des Kapillaranstieges der Bakterien beginnt.

Bei der Untersuchung des Filtrierpapieranstieges der Bakterien ist auf die Sterilität ganz besonders zu achten, da das Auftreten von hauptsächlich aus der Luft herrührenden bakteriellen Verunreinigungen zu einem vollkommen unauswertbaren Ergebnis führen kann.

Für die Versuche ist eine besonders sorgfältige Auswahl des Filtrierpapiers zu treffen. Nach unseren Erfahrungen ist nur eine solche Sorte geeignet, bei welcher das Ansteigen der physiologischen Kochsalzlösung innerhalb von 30 Minuten mindestens 14—16 cm erreicht. Vor Gebrauch ist das Filtrierpapier mittels eines Heissluftsterilisators vorsichtig zu sterilisieren. Zu unseren Versuchen verwendeten wir im allgemeinen Filtrierpapier mit Zeichen 640 W.W.

Ergebnisse

a) *Escherichia coli.* Im Rahmen der Besprechung der Methodik wollen wir zuerst die mit Escherichia coli erzielten Ergebnisse demonstrieren *(Abb. 1)*. Das untersuchte Serum wurde von einem Pferd gewonnen, welches mit verschiedenen Coli-Stämmen menschlichen und tierischen Ursprungs immunisiert wurde. Der Agglutinationstiter des Serums in

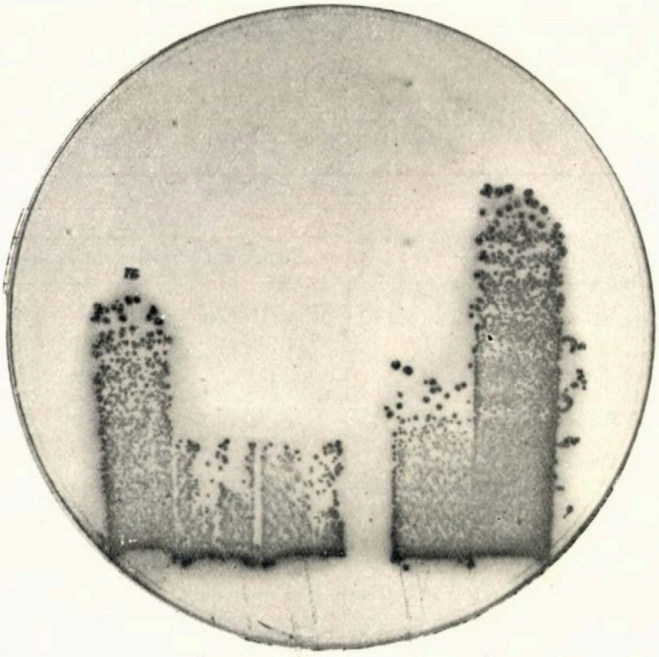


Abb. 1. Wertmessung von Coli-Immunserum mit der Filtrierpapiermethode. Abschnitt 1. die Photoaufnahme zeigt den Bakteriensuspensionsanstieg bei einer Serumverdünnung von 1 : 100. Das Verdünnungsverhältnis beträgt bei Abschnitt 2. 1 : 500, bei Abschnitt 3. 1 : 2000, bei Abschnitt 4. 1 : 10 000. — Abschnitt 5 zeigt den Anstieg der Bakteriensuspension, welche zu Kontrollzwecken mit physiologischer Kochsalzlösung vermengt wurde.

Gegenüberstellung mit dem zu der Untersuchung verwendeten Stamm betrug 1 : 3 200. Aus der Abbildung ist klar ersichtlich, dass selbst eine Verdünnung des Serums im Verhältnis von 1 : 10 000, verglichen mit der Kontrollreaktion der physiologischen Kochsalzlösung, eine prägnante Hemmung hervorruft. Die Aufnahme veranschaulicht ferner, dass eine Verdünnung des Serums im Verhältnis von 1 : 100 auf das Ansteigen der Bakterien eine geringere Hemmung ausübt als höhere Verdünnungen. Dieses Ergebnis, welches an das Präzonen-Phänomen erinnert, wiederholt sich auch bei der Untersuchung von anderen Bakterienstämmen und hängt wahrscheinlich mit einer nicht spezifischen,

stabilitätsfördernden Wirkung des untersuchten Serums auf die Bakteriensuspension zusammen.

b) *Salmonella-Gruppe.* In Fortsetzung der im vorhergehenden beschriebenen Versuche unternahmen wir Vergleichsuntersuchungen, u. zw. wurden konservierungsmittelfreie Kaninchenblutseren, welche mit den verschiedenen Stämmen der Salmonella-Gruppe immunisiert worden waren, mit der Agglutinations- bzw. mit der Kapillaranstiegmethode verglichen. *Tabelle I* enthält die Ergebnisse, aus denen ersichtlich ist, dass die mit Kapillaranstieg erhaltenen Werte mindestens 2—3mal, in Einzelfällen sogar 8—12mal höher sind als die mit der Agglutinationsmethode erzielten Titer. Nicht bloss die erhöhte Sensi-

TABELLE I

Wertmessung der Immunsera Escherichia coli und Salmonella mit Agglutinations- und Filtrierpapieranstiegmethode

Untersuchtes Kaninchenserum			
Zeichen	Zur Gewinnung und Untersuchung verwendeter Stamm	Titer	
		mit Agglutinationsmethode	mit Filtrierpapiermethode
1.	E. coli	1 : 800	1 : 4 000
2.	« «	1 : 1 600	1 : 10 000
3.	« «	1 : 3 200	1 : 10 000
4.	S. typhosa O 901	1 : 32 000	1 : 150 000
5.	« « O 901	1 : 25 600	1 : 200 000
6.	« « O 901	1 : 50 000	1 : 400 000
7.	« « H 901	1 : 64 000	1 : 150 000
8.	« « H 901	1 : 64 000	1 : 200 000
9.	« « Vi 965	1 : 3 200	1 : 20 000
10.	« « Vi 965	1 : 800	1 : 10 000
11.	S. paratyphi A	1 : 12 800	1 : 40 000
12.	« « A	1 : 6 400	1 : 10 000
13.	« « B	1 : 1 600	1 : 10 000
14.	« « B	1 : 6 400	1 : 20 000

bilität ist charakteristisch für das Kapillaranstiegsverfahren, sondern auch eine hochgradige Spezifität ; die einzelnen Immunsera hemmen bloss den Kapillaranstieg des homologen Bakterienstammes. Es versteht sich von selbst, dass zwischen gleichantigenen Stämmen, z. B. zwischen S. typhosa und S. enteriditis (Gärtner), das Vorkommen von Kreuzreaktionen festgestellt werden kann. Das mit dem untersuchten Stamm von S. typhosa erzeugte Immunserum agglutinierte den homologen Stamm bei Titer 1 : 12 800, den Stamm S. enteritidis (Gärtner) bei Titer 1 : 800. Dementsprechend hemmte das Immunserum den Kapillaranstieg des Stammes S. typhosa selbst bei einer Verdünnung von

1 : 40 000, den Kapillaranstieg des Stammes S. enteritidis (Gärtner) jedoch nur bis zu einer Verdünnung von 1 : 10 000.

In Verlauf weiterer Untersuchungen haben wir das Blutserum von Typhusrekonvaleszenten untersucht *(Tabelle II)*. Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass bei der Titeruntersuchung von Humanseren mit der Kapillaranstieg-

TABELLE II

Wertmessung des Blutserum rekonvaleszenter Typhuspatienten mit Agglutinations- und Filtrierpapieranstiegmethode

Zeichen des untersuchten Serums	Untersuchter S. typhosa Stamm	Titer des Serums	
		mit Agglutinationsmethode	mit Filtrierpapiermethode
No. 1. Humanblutserum von Rekonvaleszenten	Vi 965	1 : 200	1 : 2 000
	MÁV	1 : 800	1 : 2 000
	O 901	1 : 400	1 : 2 000
	H 901	1 : 100	1 : 500

methode ein 3—10mal höherer Titer festgestellt wurde als mit der Agglutinationsmethode. Das Kapillaranstiegverfahren wurde zur Registrierung der jahreszeitlichen Schwankungen humaner Immunsubstanzen als geeignet befunden *(Berencsy und Vajda)* [11].

c) *Shigella-Gruppe.* Im Verlauf der an der Shigella-Gruppe durchgeführten Untersuchungen wurde zuerst die Steigungshöhe der physiologischen Kochsalzsuspension einzelner Shigella-Stämme bestimmt. Aus den Versuchen ging hervor, dass der Kapillaranstieg der einzelnen Shigella-Gruppen bei gleichen Verhältnissen keine wesentlichen Abweichungen aufweist; die verhältnismässig geringste Steigung wies der Stamm Shigella dysenteriae (Shiga) auf. Hiernach wurden die aus Pferden und Kaninchen gewonnenen Shigella-Immunsera mit der Agglutinations- sowie mit der Filtrierpapiermethode titriert. (Siehe *Tabelle III.)* Diese Titrierungen brachten das gleiche Ergebnis wie die Titrierungen der Salmonella-Gruppe. Die Shigella-Immunsera entfalten eine spezifische Hemmwirkung gegen den Kapillaranstieg der Shigellen. Dieser Hemmeffekt kommt auch bei den Agglutinin-Endtiter übersteigenden Verdünnungen zur Wirkung. Das Präzonen-Phänomen kann auch hier beobachtet werden, d. h. bei geringerer Serumverdünnung gelangt der Hemmeffekt des Serums in geringerem Mass zur Geltung als bei stärkerer Verdünnung des Serums. Bei Vergleich des Kapillaranstiegendtiters mit dem Agglutinationstiter konnte eine 3—12mal höhere Sensibilität als bei der Agglutination festgestellt werden.

Im Verlauf der Untersuchungen zeigte es sich, dass — ähnlich wie bei den Ergebnissen der Salmonella-Gruppe — die monovalenten Kaninchensera den Kapillaranstieg bloss bei dem homologen Stamm hemmen. Demgegenüber erwies sich das polyvalente Agglutinations-Serum — von mit verschiede-

TABELLE III

Vergleichende Wertmessung von Shigella-Immunseren mit Agglutinations- und Filtrierpapieranstiegsmethode

Zeichen des Serums	Untersuchter Shigella-Stamm	Titer des Serums	
		mit Agglutinationsmethode	mit Filtrierpapiermethode
No. 21. Kaninchen	Sh. paradysent.	1 : 400	1 : 2 000
« 22. «	« «	1 : 800	1 : 10 000
« 23. «	« ambigua	1 : 800	1 : 10 000
« 24. «	« sonnei	1 : 1 000	1 : 4 000
« 25. «	« dysent	1 : 1 000	1 : 4 000
« 790. Pferdeserum (tetravalent)	« sonnei	1 : 400	1 : 4 000
	« ambigua	1 : 16 000	1 : 20 000
	« paradysent.	1 : 800	1 : 10 000
No. 672. Pferdeserum (bivalent)	« dysenteriae	1 : 3 200	1 : 20 000
	« paradysent.	1 : 3 200	1 : 20 000
No. 662. Pferdeserum (monovalent)	« ambigua	1 : 3 200	1 : 20 000
	« sonnei	1 : 800	1 : 10 000

nen Shigella-Stämmen immunisierten Pferden gewonnen — als den Kapillaranstieg sämtlicher Shigella-Stämme hemmend.

d) *Grampositive Kokken.* Anschliessend an die Ergebnisse, welche wir bei den gramnegativen Bakterien erzielt haben, untersuchten wir den Kapillaranstieg der grampositiven Kokken *(Vajda)* [12]. Unsere Versuche wurden mit Streptococcus haemolyticus, Streptococcus non-haemolyticus, Enterococcus, Pneumococcus und Staphylococcus-Stämmen durchgeführt. Es erwies sich, dass die Steigung der in der physiologischen Kochsalzlösung suspendierten Streptokokken auf dem Filtrierpapier innerhalb von 30 Minuten bloss 1—2 cm ausmachte. Der Anstieg von 30 verschiedenen Staphylokokkenstämmen in der physiologischen Kochsalzlösung zeigte ganz ansehnliche Abweichungen; die Steigung schwankte zwischen 1,6 und 8 cm. Die Steigungshöhe steht in keinerlei Zusammenhang weder mit der Pigmentproduktion noch mit der Pathogenität der Stämme. *Tabelle IV* zeigt einige Ergebnisse unserer Versuche. Im Laufe der weiteren Untersuchungen erwies es sich, dass bei Zugabe von normalem Kaninchenserum bis zu einer Verdünnung von 1 : 100 zu den suspendierten Bakterien die spezifischen Anstiegsverhältnisse innerhalb des Kapillarsystems eine Änderung erfahren, u. zw. erfolgt eine Zunahme des Streptokokkenanstieges bis zu einem Mittelwert von 8,3 cm. Durch Beigabe von Gelatine zu der physiologischen Kochsalzlösung kann der Kapillaranstieg der Kokken ebenfalls gesteigert werden. Dieses Phänomen hängt wahrscheinlich mit der durch die Gelatine erfolgten Stabilitätsfestigung der Bakteriensuspension zusammen; die Adsorption der Bakterien erfolgt erst zu einem späteren Zeitpunkt, daher der höhere Anstieg.

TABELLE IV

Vergleichsuntersuchung des Kapillaranstieges und einzelner biochemischer Eigenschaften der Staphylokokkenstämme

Zeichen	Pigmentproduktion	Kapillaranst. mm	Plasmakoagulierungsvermögen	Hämolysierungsvermögen	Gelatineverflüssigung
Alb. 2.	albus	10	—	—	—
Sta. 2.	aureus	12	+	+ —	—
Cit. 2.	citreus	14	+	—	—
Rost	aureus	14	—	+	+
Cit. 3.	citreus	20	+	+ —	—
Alb. 1.	albus	20	—	—	—
Sta. 1.	aureus	20	—	+ —	+
Cit. 1.	citreus	45	+	+	+
János	aureus	57	+	+ —	+
Aur. 2.	aureus	82	+	+	+

Nach Erkenntnis dieses Phänomens immunisierten wir Kaninchen mit den erwähnten grampositiven Kokken und verglichen die Wirkung der Immunsera mit dem Normalserumeffekt im Kapillarsystem. Die auf *Abb. 2* ver-

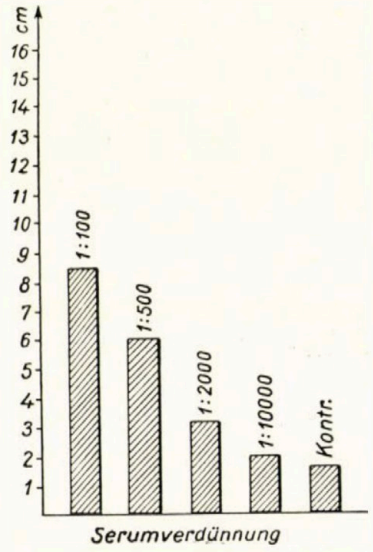


Abb. 2. Wirkung der Verdünnung normaler Kaninchensera auf den Kapillaranstieg von Streptokokkenstämmen. (Durchschnittswert von 20 Versuchen.)

zeichneten Versuche wurden mit Streptokokken-Stämmen und homologen Immunseren durchgeführt. Die Versuche laut *Abb. 3* wurden mit den

gleichen Streptokokken-Stämmen und normalen Kaninchensera durchgeführt und dienten zu Kontrollzwecken.

Nach graphischer Darstellung des Mittelwertes der Ergebnisse von 20 Versuchen konnten folgende Feststellungen gemacht werden: beide Kurven fallen mit Anstieg der Verdünnung ab. Die Immunseren üben bei einer 100-fachen Verdünnung eine äusserst starke Hemmung auf das Ansteigen der Streptokokken, im Vergleich mit dem Anstieg der gleichen Verdünnung der

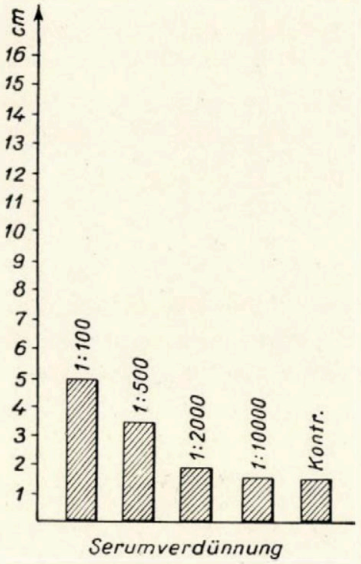


Abb. 3. Wirkung von mit Streptokokkenstämmen immunisierten Kaninchenserumverdünnungen auf den Kapillaranstieg von Streptokokkenstämmen. (Durchschnittswert von 20 Versuchen)

Normalsera, aus; die vorerwähnte Hemmwirkung hält — wenn auch in geringerem Masse — bei der 500fachen Verdünnung noch an.

Zunächst untersuchten wir die Spezifität des Verfahrens in Kontrollversuchen. Es wurden bei dieser Gelegenheit die Wirkung des Streptokokken-Immunserums auf Enterokokken, Pneumokokken und Staphylokokken geprüft. Diese Versuche bewiesen, dass das Streptokokken-Immunserum — ähnlich wie die Normalsera — das Ansteigen der erwähnten Kokken nicht vermindert, sondern fördert. Die homologen Immunseren vermindern am stärksten in der 100—500fachen Verdünnungszone den Anstieg der Pneumokokken, Enterokokken und Staphylokokken. Der spezifische Adsorptionseffekt der Immunsera kommt demnach auch bei den grampositiven Kokken zur Geltung, wenn auch nicht in dem Masse wie bei den Gliedern der Salmonella-Gruppe. Höhere Kapillaranstiegstiter können mit Streptokokken infolge der ihnen eigenen niedrigen Anstiegsverhältnisse nicht erreicht werden.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Autoren führten mit der von Vajda im Jahre 1943 veröffentlichten Methode Vergleichsversuche zur Wertmessung agglutinierender Immunsera mittels Agglutination sowie mit der Filtrierpapiermethode durch.

2. Der Kapillaranstieg der Stämme Escherichia, Salmonella und Shigella, in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert, beträgt bei gleichen Verhältnissen in 20—30 Minuten 10—12 cm.

3. Der Kapillaranstieg der Bakterien kann mit Hilfe von agglutinierenden Immunsera spezifisch gehemmt werden ; das Mass der Hemmung kann mit der Methode der Autoren auch zahlenmässig ausgedrückt werden.

4. Bei gramnegativen Darmbakterien ist die spezifische Hemmung des Kapillaranstiegs 2—10mal empfindlicher als das Agglutinationsverfahren.

5. Der Anstieg grampositiver Kokken beträgt auf Filtrierpapier 1—2 cm, innerhalb von 30 Minuten. Nach Zugabe von normalem Kaninchenserum in 100facher Verdünnung zu der Kokkensuspension schnellt der Anstieg auf 8—9 cm hinauf. Mit Beigabe von homologen Immunsera in 100facher Verdünnung kann dieser spezifische Anstieg ungefähr um die Hälfte vermindert werden. Das Verfahren eignet sich sowohl für die Separation der grampositiven Kokken als auch für den Nachweis homologer Abwehrstoffe.

LITERATUR

1. *Friedberger, E.:* Münch. Med. Wschr. **66**, 1372 (1919).
2. *Friedberger, E.* und *Putter, E.:* Münch. Med. Wschr. **67.** 398 (1920).
3. *Scott, J. M.* und *Treadwell, R. H.:* Amer. J. Med. Technol. **17**/3. 129 (1951).
4. *Putter, E.* und *Greifswald, A.:* Arch. f. Hyg. **89.** 3 (1919).
5. *Klinger, R.:* Münch. Med. Wschr. **67.** 74 (1920).
6. *Hofmann, A.:* Münch. Med. Wschr. **68.** 71 (1921).
7. *Szathmáry, J.:* Magyar Orvosi Archivum. **35.** 169 (Ung.) (1934).
8. *Vajda, Gy.:* Ztschr. f. Immunitätsf. **104.** 1 (1943).
9. *Castaneda:* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **73.** 46 (1950).
10. *Hess, W. R.* und *Roepke, M. H.:* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **77.** 468 (1951).
11. *Berencsy, Gy.* und *Vajda, Gy.:* Erscheint demnächst.
12. *Vajda, Gy.:* Festschrift Belák. 132 (Ung.) (1948).
13. *Vajda, Gy.* und *Backhausz, R.:* Vortrag, gehalten anlässlich des I. Kongress der Ungarischen Mikrobiologischen Gesellschaft. 1952.
14. *Darányi, Gy.:* Zbl. f. Bakt. O. I. **99.** 74. (1926).

ОЦЕНКА АГГЛЮТИНИРУЮЩИХ ИММУННЫХ СЫВОРОТОК СПОСОБОМ ФИЛЬТРОВАЛЬНОЙ БУМАГИ

Дь. Вайда, и. Р. Бакхаус

Резюме

Применяя описанный в 1943 году метод Вайды, авторы производили сравнительные опыты с целью оценки агглютинирующих способностей иммунных сывороток, частью путем агглютинации и частью с помощью метода фильтровальной бумаги.

Опыты производились таким образом, что из подлежащей титрованию сыворотки приготовляли различные разведения и из каждого разведения выливали в стерильные чашки »Петри« по 10—10 мл. К разбавленным сывороткам в таком же количестве добавлялась взвесь, содержащая по 500 миллионов живых бактерий на 1 мл. взвеси. В разведение спускали полоску фильтровальной бумаги 20 мм ширины и 200 мм длины, затем с этой полоски делали оттиск на агаре. Агаровые пластинки в течение одних суток инкубировали в термостате при 37° С. Степень, до которой бактерии поднялись по полоске фильтровальной бумаги, точно определяется на основании выросших колоний. С целью контроля взвесь бактерий вместо разбавленных сывороток смешивалась с физиологическим раствором поваренной соли.

Капиллярный подъём взвешенных в физиологическом растворе поваренной соли штаммов Сальмонелла, Шигелла и Эшерихия (Salmonella, Shigella, Escherichia) при одинаковых условиях достигал 10—12 см в течение 20—30 минут. Имеется возможность специфического торможения капиллярного подъема бактерии с помощью агглютинирующих иммунных сывороток. Степень торможения по методу авторов может быть выражен и в цифровых данных. Специфическое торможение капиллярного подъема грамотрицательных кишечных бактерий является в 2—10 раз чувствительней метода агглютинации.

Подъём по фильтровальной бумаге грам-положительных кокков в течение 30 минут достигает только 1—2 см, капиллярный подъем стафилококков не зависит от пигментообразующих и биохимических свойств штаммов. Если к взвеси добавить нормальную сыворотку кроликов в 100-кратном разбавлении, то подъем кокков возрастет до 8—9 см. Этот подъем можно снизить приблизительно на половину добавлением гомологичной иммунной сыворотки в 100-кратном разведении. Гомологичные иммунные сыворотки в малой степени тормозят капиллярный подъем кокков даже и при 500-кратном разбавлении. Торможение капиллярного подъема в большой степени специфично. Указанный метод может применяться как для разобщения грам-положительных кокков, так и для определения гомологичных антител.

NERVENSYSTEM UND IMMUNITÄT I. WIRKUNG VON BARBITURAT-DAUERSCHLAF AUF DEN IMMUNKÖRPERTITER DES BLUTES

Von
L. KESZTYÜS, T. SZILÁGYI und F. GYULAI

Institut für Pathophysiologie der Medizinischen Universität, Debrecen

Eingegangen am 6. August 1953

Im Laufe der letzten Jahre rückte die experimentelle Untersuchung des Einflusses und der Rolle des Nervensystems auch bei immunbiologischen Vorgängen in den Mittelpunkt des Interesses. Die wichtigste Feststellung der diesbezüglichen, ziemlich umfangreichen, doch hinsichtlich der Einzelheiten noch keineswegs befriedigenden Literatur kann dahin zusammengefasst werden, dass durch die Trennung der allgemeinen physiologischen Gesetzmässigkeiten und der immunologischen Probleme auf Grund der traditionellen Virchowschen Anschauungen, durch die willkürliche Separierung der immunbiologischen Phänomene von der Einheit des Gesamtorganismus die Entwicklung der wissenschaftlichen Immunbiologie heute bereits ausgesprochen gehemmt ist. Die Immunprozesse müssen als eine Adaptationsreaktion angesehen werden, die im allerengsten Zusammenhang mit der Physiologie des Eiweissstoffwechsels steht. Da die adaptative Schutzreaktion trotz der Vielfalt und grossen Ausdehnung der in der Immunreaktion teilnehmenden Gewebe mit einer strengen Regelmässigkeit vor sich geht, darf ein zentraler leitender und koordinierender Regulationsmechanismus angenommen werden. In dieser Regulation kommt nun offensichtlich dem Nervensystem die determinierende Rolle zu.

Auf Grund dieser Überlegungen wurden im vergangenen Jahr (1952) in unserem Institut Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen Nervensystem und immunbiologischen Prozessen in Angriff genommen. Hier soll nun über jene Versuche berichtet werden, die der Klarstellung des Einflusses des Dauerschlafes auf die Menge der bei künstlicher Immunisierung im Blute erscheinenden Immunkörper dienten. Bekanntlich ist der Schlaf laut der Definition von *Pawlow* als eine Schutzhemmung anzusehen, welche die Nervenzellen vor einer übermässigen Erschöpfung schützt. »Wenn im Nervensystem die Hemmungsvorgänge erscheinen und das Übergewicht erlangen, so ist dies eine physiologische Massnahme gegen die Krankheit und die grössere Zerstörung bezweckt die Abwehr einer ernsteren Gefahr. Daraus lässt sich eine eindeutig bestimmte therapeutische Methode ableiten« *(Pawlow)*. Auf Grund der Feststellungen *Pawlows* wird der Dauerschlaf in der klinischen Therapie der verschiedensten Krankheiten immer häufiger und immer erfolgreicher angewandt.

Auffallend spärlich sind dagegen die Literaturangaben über den Einfluss des Dauerschlafes auf die Immunprozesse. Aus der zugänglichen neuen Literatur ist die von *Sdrodowski* [1] durchgeführte Untersuchungsreihe hervorzuheben, worin er an Kaninchen, die mit Pferdeserum sensibilisiert waren, die Entstehung der allergischen Arthritis durch tiefe Urethannarkose verhinderte. Bemerkenswert sind auch die Untersuchungen von *Benetato* [2], in denen es gelang, an immunisierten Tieren die auf Verabreichuug des homologen Antigens regelmässig eintretende Bakteriotropinerhöhung und Leukozytose durch Barbiturate zu blockieren. *Hosak* [3] erzielte durch Dauerschlaf gute Ergebnisse bei Meerschweinchen, die sich im künstlich ausgelösten, mit ausgeprägten Funktionsstörungen der oberen Teile des Zentralnervensystems einhergehenden allergischen Zustand befanden. Diese und zahlreiche andere Untersuchungen berühren indessen nicht so sehr die Zusammenhänge zwischen dem Dauerschlaf und der Immunreaktion, sondern beziehen sich eher auf den Einfluss des Dauerschlafes auf die Reaktionen zwischen den zuvor entstandenen Immunkörpern und dem neuerdings eingeführten Antigen. Daher schien es angebracht, die Zusammenhänge zwischen Dauerschlaf und Immunkörpertiter des Blutes einer Untersuchung zu unterziehen.

Methodik und Versuchsergebnisse

Zu den Versuchen wurden voll entwickelte männliche Kaninchen verwendet, die 22 Tage hindurch im Dauerschlaf gehalten wurden. Der Dauerschlaf wurde anfänglich gruppenweise abwechselnd mit Diäthyl- bzw. Phenyläthylbarbitursäure herbeigeführt, später wurde immer Phenyläthylbarbitursäure angewandt. Die Anwendung der Barbiturate in unseren Versuchen scheint durch verschiedene Umstände gerechtfertigt. Einerseits ist aus der Mitteilung von *Iwanow-Smolenski* [4] bekannt, dass nach den Erfahrungen sowjetischer Forscher im Tierversuch sich das Amytalnatrium — infolge seiner verhältnismässig niedrigen Toxizität — als das beste Mittel zum Dauerschlaf erwiesen hat, andererseits üben die Barbiturate — was hiermit eng zusammenhängt — auf den Stoffwechsel keinen allzu grossen Einfluss aus [5]. Dieser Umstand ist wegen der seit langem bekannten engen Verknüpfung von Immun- und Stoffwechselprozessen von Bedeutung. Es wurde z. B. von *Zabolotny* [6], *Chahovitch* [7] und *Hausmann* [8] nachgewiesen, dass während des Winterschlafes die Immun- und Stoffwechselprozesse gleicherweise beträchtlich reduziert werden. Für die Barbiturate spricht ferner der Umstand, dass sie auch den Eiweissstoffwechsel nicht schädigen. *Hemingway* [9] konnte selbst nach grossen Barbituratdosen weder Veränderungen im Eiweissspiegel noch im Reststickstoff- und Karbamidgehalt des Plasmas feststellen.

Im ersten Versuch wurden 23 Kaninchen in 3 Gruppen geteilt. Die 9 Tiere der ersten Gruppe erhielten 22 Tage hindurch i. p. täglich 9 mg Phenyläthyl-

barbiturat je 100 g Körpergewicht in der Weise, dass die Barbituratverabreichung an jedem 5. Tage unterbrochen wurde. Die Unterbrechung des Dauerschlafes erwies sich als notwendig, weil die in den Vorversuchen ausprobierte Ernährung der Tiere durch die Magensonde auf technische Schwierigkeiten stiess: die Sonde wurde nämlich von den ziemlich tief schlafenden Kaninchen nicht geschluckt, so dass die Nährflüssigkeit bei der zweimal am Tage vorgenommenen Fütterung früher oder später in die Bronchien geriet. Infolge der Unterbrechung des Dauerschlafes nahmen die Tiere dagegen jeden fünften Tag Nahrung zu sich. Während der vier Schlaftage befanden sich die Tiere durch 5—12 Stunden nach der Barbituratinjektion in tiefem Schlaf, während sie später eher nur schlummerten, auf dem Bauche lagen, sich spontan nicht bewegten, auf Schallreize jedoch einige schwankende Schritte taten, ihren Kopf erhoben usw. Auch während des 5., d. h. des Pausentages, blieben sie zumeist hingestreckt liegen, doch näherten sie sich der gereichten Nahrung, nahmen etwas von ihr zu sich, wobei gelegentlich auch schwankende Spontanbewegungen beobachtet werden konnten. Neun Tiere der zweiten Gruppe erhielten unter völlig gleichen Umständen 13 mg Diäthylbarbiturat. Die 5 Tiere der dritten Gruppe dienten dagegen als nicht narkotisierte Kontrollen. Alle 23 Tiere wurden jeden vierten Tag fünfmal mit Pferdeserum in steigenden Dosen i. v. immunisiert. Das Körpergewicht der Tiere wurde jeden vierten Tag kontrolliert. Es stellte sich hierbei heraus, dass eine nur jeden 5. Tag erfolgende Nahrungsaufnahme unzureichend ist, da das Körpergewicht der Tiere ständig abnahm und 11 von den 18 narkotisierten Tieren eingingen. Die Sektionsbefunde waren nicht einheitlich, doch herrschten im allgemeinen Pneumoniesymptome vor. Den überlebenden Tieren wurde am 26. Tage zur Durchführung von Präzipitationsreaktionen im Serum Blut entnommen. Die Ergebnisse sind in Tabelle I angeführt.

TABELLE I

Präzipitationstiter der mit Pferdeserum immunisierten Kaninchen

Kaninchen Nr.	Phenyläthyl-barbiturat	Kaninchen Nr.	Diäthyl-barbiturat	Kaninchen Nr.	Kontrolle
2	1 : 25 000	10	1 : 25 000	19	1 : 12 000
4	1 : 25 000	14	1 : 50 000	20	1 : 25 000
6	1 : 12 000	17	1 : 12 000	22	1 : 12 000
8	1 : 12 000			24	1 : 12 000
				26	1 : 25 000

Wie aus der Tabelle ersichtlich, besteht zwischen den Präzipitintitern der überlebenden narkotisierten Tiere und denen der Kontrollen kein Unterschied.

Da die beschriebenen Versuchsbedingungen zu drastisch waren, wurden im weiteren mildere Narkoseverfahren ausprobiert, als deren Endresultat

dann folgende Methode gewählt wurde: die Tiere erhielten jeden zweiten Tag 10 mg Phenyläthylbarbiturat je 100 g Körpergewicht i. p. Es trat nun für 6—14 Stunden ein tiefer Schlaf ein, der von 12—16 Stunden leichterem Schlafe abgelöst wurde. Hiernach schlummerten die Tiere auf dem Bauche liegend weiter, ganz selten bewegten sie sich auch spontan, näherten sich der gegebenen Nahrung und verzehrten diese in weit grösserer Menge als im vorigen Versuch. Während dieses Dauerschlafes änderte sich das Körpergewicht nicht wesent-

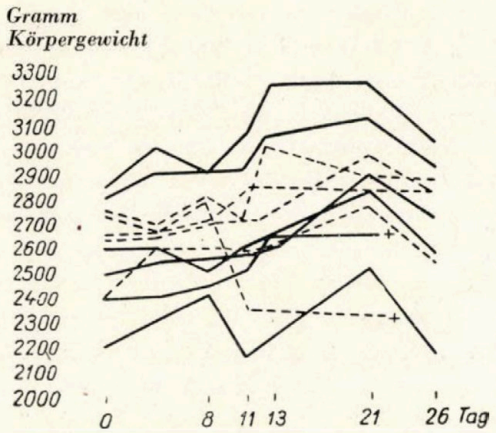


Abb. 1. Gewichtsveränderung der narkotisierten und nicht narkotisierten Kaninchen
——————— narkotisierte Kaninchen
— — — — — — nicht narkotisierte Kaninchen
\+ verendete Kaninchen

lich bzw. schwankte ähnlich wie bei den nicht narkotisierten Kontrollen (s. Abb. 1).

Aus der Körpergewichtskurve der 6 narkotisierten Kaninchen ist deutlich zu ersehen, dass der Dauerschlaf zu keiner wesentlichen Körpergewichtsabnahme führte. In beiden Gruppen verendete je ein Tier infolge Lungenentzündung am 22. bzw. 23. Tage. Zwischen den Körpergewichtskurven der narkotisierten Tiere und Kontrollen besteht kein nennenswerter Unterschied.

Da es sich in den Vorversuchen herausstellte, dass die übliche energische Immunisierungsmethode selbst bei den drastisch in Dauerschlaf gehaltenen Tieren das Auftreten von Präzipitinen im Blut nicht beeinflusst, wurde der Immunkörpergehalt im Blut der Dauerschlaf- und der Kontrollkaninchen auch während der Immunisierung geprüft. Um aber zu vermeiden, dass infolge der zur Präzipitationsreaktion notwendigen grösseren Blutentnahme Komplikationen auftreten, schien es angezeigt, in den Versuchen auch mit geringeren Blutmengen durchführbare Agglutininreaktionen anzuwenden. Die Versuchstiere wurden also nunmehr jeden vierten Tag durch i. v. Einspritzung von je

1 ml 20%iger Rinder- bzw. Hammelerythrozytensuspension 5mal immunisiert, wobei vor jeder Antigeninjektion sowie auch am 20. und 26. Tage 2 ml Blut entnommen wurden, um mit den Seren Agglutinationsreaktionen auszuführen. Da bekanntlich zwischen den einzelnen Individuen beträchtliche Unterschiede in bezug auf das Ausmass der Immunkörperproduktion bestehen können, wurden die Versuche zur Verminderung der sich hieraus ergebenden Fehler auf folgende Weise durchgeführt. Die Tiere wurden zunächst in vier Gruppen geteilt. Die 7 Kaninchen der ersten Gruppe wurden während des Schlafes mit Rindererythrozyten immunisiert und dann nach einer Ruheperiode von 7—12 Tagen ohne Narkose mit Hammelerythrozyten behandelt. Die 7 Kaninchen der zweiten Gruppe wurden zuerst ohne Narkose mit Hammelerythrozyten immunisiert und dann nach einigen Ruhetagen mit Phenyläthylbarbiturat nach der oben beschriebenen Methode narkotisiert, wobei ihnen gleichzeitig Rindererythrozyten verabreicht wurden. Bei den 6 Tieren der dritten Gruppe erfolgte die Immunisierung zuerst durch Rindererythrozyten ohne Narkose, und dann nach einigen Ruhetagen durch Hammelerythrozyten während des Dauerschlafes. Die vierte Gruppe bestand aus 5 Kaninchen, die zuerst während des Dauerschlafes mit Hammelerythrozyten und dann ohne Narkose mit Rindererythrozyten behandelt wurden. Auf diese Weise diente jedes Tier sich auch insofern selbst zur Kontrolle, als es einmal während des Dauerschlafes und einmal ohne diesen mit Rinder- bzw. Hammelerythrozyten immunisiert wurde, wobei zwischen der Antigenstärke der zweierlei Blutkörperchen — wie noch gezeigt werden soll — kein wesentlicher Unterschied besteht. Inzwischen wurden mit den an jedem 4. Tag gewonnenen Seren Agglutinationsreaktionen ausgeführt und gleichzeitig wurde auch der Agglutinintiter bestimmt.

Abb. 2 zeigt die Ergebnisse der Immunisierung von 13 Dauerschlaf- und 11 Kontrollkaninchen mit Rindererythrozyten. Von den 13 Tieren im Dauerschlaf hatten 7 vorhergehend keinerlei Behandlung erhalten; diese überlebten alle den Versuch. Die restlichen 6 Tiere wurden ohne Narkose vorhergehend mit Hammelerythrozyten immunisiert; von diesen sechs Tieren ging das eine während des Versuches am 22. Tage ein. Von den 11 Kontrolltieren hatten 6 vorhergehend keinerlei Behandlung erhalten, auch diese überlebten alle den Versuch. Von den 5 Tieren hingegen, die vorhergehend während des Dauerschlafes mit Hammelerythrozyten immunisiert wurden, verendeten am 6. Tage eines und am 13. Tage zwei weitere Tiere. Von den 24 Tieren gingen also 1 narkotisiertes Tier und 3 Kontrollen während des Versuches ein. Was nun die Agglutinationsergebnisse anbelangt, so geht aus Abb. 2 klar hervor, dass der Agglutinintiter vom 8.—12. bis zum 16. Tage im Blute der Dauerschlaftiere wesentlich niedriger ist als im Blute der nicht narkotisierten Kontrollen. Die Ergebnisse wurden auch statistisch ausgewertet, wobei sich die Differenz als signifikant erwies. Da bei der Ablesung der Ergebnisse der Agglutinationsreaktion nicht die Verdünnungen in Betracht gezogen wurden, sondern nur untersucht

wurde, welches das letzte Reagenzglas ist, in dem eine Agglutination noch wahrgenommen werden kann, wurde die mathematische Auswertung auch noch in der Weise durchgeführt, dass nicht die Titer, sondern die Reagenzglasnummern miteinander verglichen wurden. Auf diese Art sind zwar die Unterschiede geringer, da mathematisch die Differenz zwischen der 80- und 320fachen Verdünnung

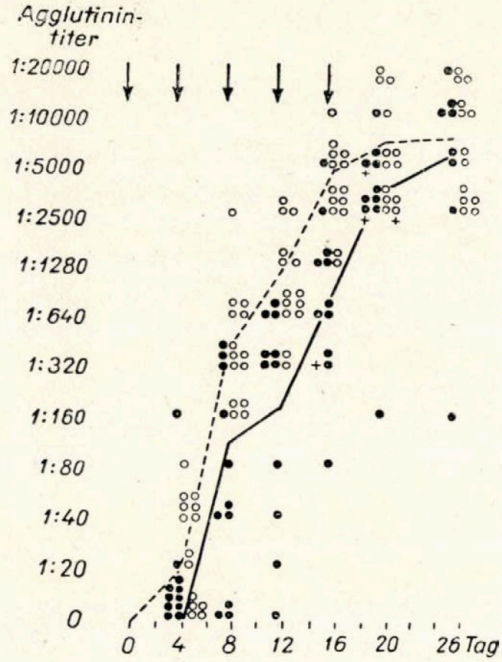


Abb. 2. Immunisierung mit Rindererythrozyten
• • • • • • • narkotisierte Kaninchen
○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ nicht narkotisierte Kaninchen
\+ verendete Kaninchen
↓ Antigeninjektion (1 ml 20%ige Suspension)

grösser ist als zwischen dem 3. und 5. Glas, doch war es unserer Meinung nach äusserst beruhigend, dass sich zwischen den Agglutinationsreaktionen der Dauerschlaftiere und Kontrollen auch hierbei am 8., 12. bzw. 16. Tag ein beachtlicher Unterschied ergab. Die Untersuchung der am 20. Tage entnommenen Sera zeigte eine Abnahme des Unterschiedes zwischen den Agglutininwerten der narkotisierten Tiere und den Kontrollen ; am 26. Tage war überhaupt kein Unterschied mehr festzustellen.

Die Ergebnisse der Immunisierung von 11 narkotisierten und 14 Kontrollkaninchen mit Hammelerythrozyten sind in Abb. 3 dargestellt. Von den 11 Dauerschlafkaninchen hatten 5 keinerlei Vorbehandlung erhalten, und diese überlebten den Versuch ohne Ausnahme. Die restlichen 6 Tiere hingegen wurden

vor dem Dauerschlaf mit Rindererythrozyten immunisiert; von diesen gingen während des Versuches 3 Tiere am 17. bzw. 22. Tage ein. Von den 14 Kontrolltieren war 7 keinerlei Vorbehandlung zuteil geworden, von diesen verendete eines am 22. Tage. Die übrigen 7 Kaninchen wurden zuvor während des Dauerschlafes mit Rindererythrozyten immunisiert, wobei sämtliche am Leben

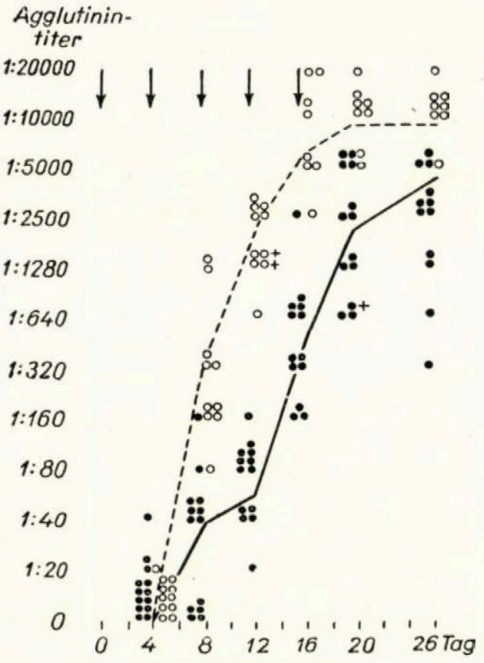


Abb. 3. Immunisierung mit Hammelerythrozyten
• • • • • • • narkotisierte Kaninchen
○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ nicht narkotisierte Kaninchen
\+ verendete Kaninchen
↓ Antigeninjektion (1 ml 20%ige Suspension)

blieben. Von den insgesamt 25 Tieren gingen also auch in dieser Gruppe 4 ein, doch im Gegensatz zum vorigen Versuch diesmal 3 narkotisierte und 1 Kontrollkaninchen. Bezüglich des Agglutinintiters stimmen die Ergebnisse mit dem vorigen Versuch überein. Bei den Dauerschlafkaninchen erhöht sich der Agglutinintiter langsamer als bei den Kontrolltieren, am 20. Tage, nach der 5. Antigeninjektion ist aber der Titerwert von Versuchs- und Kontrolltieren gleich. Die beobachteten Unterschiede sind laut der statistischen Auswertung am 8., 12. bzw. 16. Tage signifikant.

Aus den bisherigen Untersuchungen lässt sich also feststellen, dass die Hämagglutininmenge im Blute der dauernarkotisierten Kaninchen nach der 1. und 2. Antigeninjektion wesentlich geringer ist als im Blute der Kontroll-

tiere ; nach den weiteren Antigeninjektionen ist aber auch bei den Dauerschlaftieren der hohe Agglutinintiter der Kontrolltiere zu beobachten.

Aus dem Vergleich des Agglutinintiters der Kontrollkaninchen geht hervor, dass zwischen der Immunisierung mit Rinder- und Hammelerythrozyten unter sonst gleichen Bedingungen kein wesentlicher Unterschied in den erhaltenen Agglutininwerten besteht, d. h. dass bei der gleichen Immunisierungs-

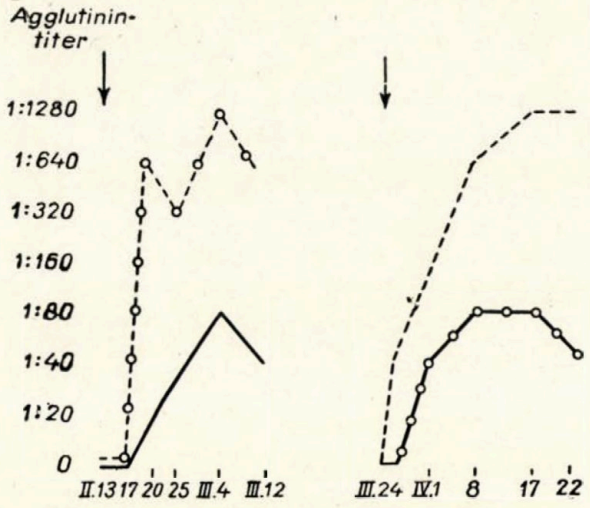


Abb. 4. Immunisierung mit je 1 Antigeninjektion
links : 1 ml 20%ige Suspension von Hammelerythrozyten
rechts : 1 ml 20%ige Suspension von Rindererythrozyten
———— Kaninchen Nr. 372 (narkotisiert)
— — — — — Kaninchen Nr. 372 (nicht narkotisiert)
o—o—o—o—o— Kaninchen Nr. 390 (narkotisiert)
o- -o- -o- -o- -o- -o Kaninchen Nr. 390 (nicht narkotisiert)
↓ Antigeninjektion

methode die Antigenstärke der Rinder- und Hammelerythrozyten im grossen und ganzen gleich ist.

Da diese Versuche den Beweis erbracht hatten, dass der Dauerschlaf die Menge der infolge des 1. und 2. Antigenreizes entstandenen Immunkörper im Blute vermindert, während die weiteren Antigendosen diese Hemmung aufheben, wurden die Antigeneinspritzungen in den nächsten Versuchen nicht fünfmal, sondern nur einmal bzw. zweimal angewandt.

Die in Abb. 4 gezeigten zwei Kaninchen erhielten während des Dauerschlafes und ohne diesen je eine Antigeninjektion. Es ist aus der Kurve gut ersichtlich, dass das Kaninchen Nr. 372, das während des Dauerschlafes einmal mit Hammelerythrozyten behandelt wurde, einen weit niedrigeren Agglutinin-

titer aufweist als ohne Narkose nach einmaliger parenteraler Verabreichung von Rindererythrozyten. Beim Kaninchen Nr. 390 sind die Versuchsbedingungen umgekehrt. Es wurde ohne Narkose einmal durch Injektion von Hammelerythrozyten immunisiert, wobei ein hoher Titer erhalten wurde. Auf eine einmalige Gabe von Rindererythrozyten während des Schlafes reagierte dagegen das Tier mit einem niedrigeren Agglutinintiter. Zwei weitere Versuchsreihen ergaben gleichfalls damit übereinstimmende Resultate.

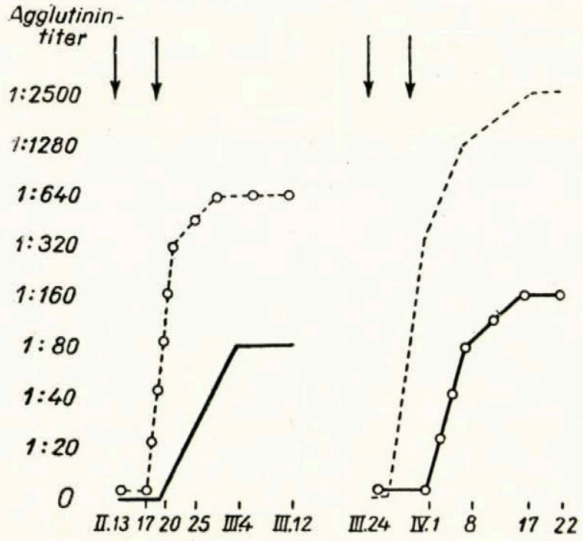


Abb. 5. Immunisierung mit je 2 Antigeninjektionen
links: je 1 ml 20%ige Suspension von Hammelerythrozyten
rechts: je 1 ml 20%ige Suspension von Rindererythrozyten
——— Kaninchen Nr. 302 (narkotisiert)
— — — — — Kaninchen Nr. 302 (nicht narkotisiert)
o—o—o—o—o— Kaninchen Nr. 304 (narkotisiert)
o- -o- -o- -o- -o- -o Kaninchen Nr. 304 (nicht narkotisiert)
↓ Antigeninjektion

In Abb. 5 wird ein im Wesen und im Ergebnis ähnlicher Versuch bei zweimaliger Gabe des Antigens gezeigt. Das Kaninchen Nr. 302 wurde zuerst während des Schlafes zweimal mit Hammelerythrozyten immunisiert und dann ohne Narkose gleichfalls zweimal mit Rindererythrozyten. Beim narkotisierten Tier war der Titer niedrig, im nicht narkotisierten Zustand hoch. Beim Kaninchen Nr. 304, das zuerst ohne Narkose zweimal mit Hammelerythrozyten und dann während des Dauerschlafes gleichfalls zweimal mit Rindererythrozyten behandelt wurde, ist ein analoges Verhalten zu beobachten: die Agglutininmenge im Blut ist nach Immunisierung im Dauerschlaf wesentlich geringer als im wachen Zustande.

Diskussion

Aus den geschilderten Versuchen geht eindeutig hervor, dass der durch die subkortikal wirkende Phenyläthylbarbitursäure hervorgerufene Dauerschlaf die Anreicherung der Immunkörper im Blute verlangsamt, hemmt. Diese Hemmung ist jedoch keine absolute, sie tritt nur beim 1. und 2. Antigenreiz in Erscheinung, die weiteren Antigendosen durchbrechen die Hemmung, und nach mehrmaliger Verabreichung des Antigens bildet sich im Blut ein gleich hoher Titer von Immunkörpern wie bei den nicht narkotisierten Kontrolltieren. Diese Beobachtung erklärt auch die Ergebnisse unserer ersten Versuche mit Pferdeserum, in denen trotz der drastischen Dauernarkose kein Unterschied im Präzipitintiter der Versuchs- und Kontrolltiere festzustellen war, wahrscheinlich deshalb, weil bei fünfmaliger Antigeneinspritzung der Präzipitintiter nur am Ende der Behandlung und nicht fortlaufend untersucht wurde. Die Tatsache, dass die Barbitursäurenarkose den Agglutinintiter beim 1. bzw. 2. Antigenreiz nicht durch Verdünnung des Blutes, durch künstliche Hydrämie niedrig hält, wurde in der Weise nachgeprüft, dass bei einem Drittel der Tiere gleichzeitig mit der Titerbestimmung auch der Gesamteiweissgehalt des Serums bestimmt wurde. Dieser weist bei den Versuchs- und Kontrolltieren individuelle Unterschiede auf; er schwankt zwischen 4,36 und 5,07%, doch war während des Versuches keine wesentliche Änderung am einzelnen Tier festzustellen. Auf diese Weise kann also im Einklang mit den Ergebnissen von *Hemingway* und Mitarbeitern bestätigt werden, dass die Verabreichung von Phenyläthylbarbiturat keine wesentliche Veränderung im Eiweissgehalt des Serums hervorruft. Nichtsdestoweniger muss aber in Zweifel gezogen werden, dass die Narkose mit einem Barbiturat den Eiweissstoffwechsel nicht beeinflusst. Der Umstand, dass während des Dauerschlafes mit Phenyläthylbarbitursäure sich die Immunglobuline im Blut erst nach mehrmals wiederholter Antigeneinspritzung in einer ähnlichen Menge anhäufen wie im Blute der Kontrollen, beweist, dass der Eiweissstoffwechsel während der Barbitursäurenarkose in geringerem Ausmasse imstande ist, sich den aus der Umgebung einwirkenden Reizen anzupassen. Dies bedeutet aber zweifelsohne auch dann eine Veränderung im Eiweissstoffwechsel, wenn mit chemischen Methoden keine solche im Eiweissgehalt des Serums nachgewiesen werden kann.

Trotz alledem wäre es aber unseres Erachtens verfehlt, aus den Ergebnissen der geschilderten Versuche den Schluss zu ziehen, dass eine klinische therapeutische Anwendung des Dauerschlafes infolge der relativ gehemmten, verminderten Immunkörperproduktion kontraindiziert ist. Erstens wurden nämlich die Versuche an Kaninchen ausgeführt, ihre Ergebnisse können somit nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen werden. Zweitens ist die Hemmung keine absolute, da wiederholte Antigenreize die Hemmung durchbrechen. Drittens — und das dünkt uns am wichtigsten — stellt die Immunreaktion des

Organismus im Endergebnis nur die eine Seite des Problems dar. Nach *Zabolotny* und anderen Forschern ist es bekannt, dass bei Tieren im Winterschlaf nicht nur die Immunreaktion reduziert ist — mit dieser Feststellung stehen übrigens auch die hier besprochenen Versuchsergebnisse im vollen Einklang —, sondern auch die Empfänglichkeit des Makroorganismus gegenüber den infektiösen Mikroorganismen. Auf diese Weise kann sich während des Dauerschlafes die Reduktion der Immunreaktion und der Empfänglichkeit ausgleichen, so dass also der narkotisierte Organismus der Infektion gegenüber nicht ungeschützter dasteht als der nicht narkotisierte.

Zum Schluss ist noch die Frage zu klären, ob aus der Tatsache, dass der Immunkörpertiter des Blutes nach den ersten Antigenreizen während des Dauerschlafes niedriger ist, auf eine Hemmung der Immunkörperproduktion geschlossen werden kann. Diese Frage besitzt zweifellos eine Berechtigung, da es theoretisch vorstellbar ist, dass zwar die Produktion der Immunglobuline während des Dauerschlafes normal ist, dass aber die Gewebe der narkotisierten Tiere mehr Immunglobuline adsorbieren bzw. binden, so dass auf diese Weise weniger in die Blutbahn gelangen. Die in der Immunologie stillschweigend akzeptierte Auffassung, dass der Immunkörpertiter des Blutes stets das Ausmass und die Geschwindigkeit der Immunkörperproduktion getreulich widerspiegelt, ist keineswegs als erwiesen anzusehen. Diese Auffassung ist nämlich, obwohl sie recht verbreitet ist, dennoch unrichtig, da sie die von den Geweben adsorbierten und im kreisenden Blute nicht nachweisbaren Immunkörper völlig ausser acht lässt. In unserem Institut sind jetzt Versuche zur Mengenbestimmung der an die Gewebe gebundenen Immunkörper im Gange. Eine Erforschung der Zusammenhänge zwischen dem Nervensystem und der Immunität ohne Kenntnis der Menge der von den Geweben und Zellen adsorbierten Immunkörper, insbesondere eine Untersuchung der Dynamik der Immunkörperbildung, gleicht gewissermassen einem Herumtappen im Dunklen, da es möglich ist und angenommen werden darf, dass das Nervensystem nicht nur die Bildung der Immunglobuline, sondern auch ihre Verteilung zwischen dem Blut und den Geweben beeinflusst.

ZUSAMMENFASSUNG

Kaninchen, die 22 Tage hindurch mit Barbituraten in Dauerschlaf gehalten waren, wurden mit Pferdeserum energisch immunisiert, wobei die am Ende des Versuches ausgeführten Präzipitationsreaktionen keinen Unterschied zwischen dem Präzipitationstiter der überlebenden narkotisierten Tiere und der Kontrollen ergaben. Es wurde danach eine Dauerschlafmethode ausgearbeitet, bei der kein grösserer Körpergewichtsverlust der Tiere eintrat. Die Kaninchen wurden während des Dauerschlafes bzw. ohne Narkose mit Rinder- bzw. Hammelerythrozyten immunisiert. Der Hämagglutinintiter des Blutes wurde fortlaufend kontrolliert. Es konnte festgestellt werden, dass bei der gleichen Immunisierungsmethode zwischen der Antigenstärke der Rinder- bzw. Hammelerythrozyten kein wesentlicher Unterschied besteht. Die erhaltenen Ergebnisse liessen eindeutig erkennen, dass der durch ein Barbiturat hervorgerufene Dauerschlaf die Anrei-

cherung der Immunkörper im Blute hemmt. Diese Hemmung ist jedoch nicht absolut, sie zeigt sich nur beim 1. bzw. 2. Antigenreiz; weitere Antigengaben durchbrechen die Hemmung und nach mehrmaliger Antigeneinspritzung ist im Blut der in Dauerschlaf versetzten Tiere ein gleich hoher Immunkörpertiter nachweisbar wie bei den Kontrollen.

LITERATUR

1. *Здродовск й, П. Ф.:* Клиническая Медицина Nr. 3, 3 (1951).
2. *Benetato, G.:* Revista Stiintelor Medicale. Medicina Interna. Anul. **IV.** No. 9, 2 (1952).
3. *Hosak, L. E.:* zitiert auf Grund des Artikels von *Ivanow-Smolenski, A. G.* [4].
4. *Иванов-Смоленский А. Г.:* Журнал высшей нервной деятельности **3**, 347 (1951)
5. *Kochmann, M.:* Narcotica der Fettreihe. Heffters Handbuch der Exp. Pharm. Ergänzungswerk. II. Bd. — Julius Springer. Berlin 1936. S. 159.
6. *Zabolotny, D.:* Zbl. Bakter. I. Orig. **106**, 397 (1928).
7. *Chahovitch, X.:* C. r. Biol. Paris **84**, 731 (1921).
8. *Hausmann, W.:* Pflügers Arch. **113**, 317 (1906).
9. *Hemingway, M. W., van de Erve, J.* und *Booth, J. D.:* J. Labor. a. clin. Med. **19.** 738 (1934).

НЕРВНАЯ СИСТЕМА И ИММУНИТЕТ. СООБЩЕНИЕ 1. ВЛИЯНИЕ БАРБИТУРАТНОГО СНА НА ТИТР АНТИТЕЛ КРОВИ

Л. Кестьюш, Т. Силадьи и Ф. Дьюлаи

Резюме

Наркотизированных барбитуратами кроликов в течение 22 дней сильно иммунизировали белком лошадиной сыворотки. Согласно проведенным в конце процедуры реакциям преципитации, не было разницы между титром преципитина переживших опыт наркотизированных животных и контрольных. Был выработан такой способ длительного сна, в течение которого вес животных не теряется в значительной степени. Наркотизированных и контрольных, не усыпленных животных иммунизировали коровьими и овечьими эритроцитами. В процессе процедуры систематически проверяли титр гемаглютининов крови. Установлено, что при одинаковом способе иммунизации антигенная интенсивность коровьих и овечьих эритроцитов не имеет резкого отличия. В результате опытов доказано, что длительный барбитуратный сон тормозит размножение антител в крови. Это торможение однако не является абсолютным, так как происходит только при 1—2. антигенном раздражении. Дальнейшие дозы антигена снимают торможение, и после многократного введения антигена титр антител в крови наркотизированных животных становится подобным титру антител контрольных, не усыпленных животных.

NERVENSYSTEM UND IMMUNITÄT II. KÖNNEN SICH UNTER SEKUNDENLANGER EINWIRKUNG VON ANTIGENREIZEN SPEZIFISCHE ABWEHRSTOFFE BILDEN?

Von
L. KESZTYÜS, S. SZALAY, L. KOCSÁR, L. KERTÉSZ und J. SALÁNKI

Institut für Pathophysiologie der Medizinischen Universität, Debrecen, und Institut für experimentelle Physik der Ludwig-Kossuth-Universität, Debrecen

Eingegangen am 21. September 1953

Eine der ältesten Theorien, die in bezug auf die Bildung von Immunglobulinen aufgestellt worden sind, ist die Hypothese *Pfeiffers* [1], laut welcher das parenteral injizierte Antigen als spezifischer Reiz wirkt und die Sekretion eines entsprechenden bestimmten, spezifischen Eiweisses, des Abwehrstoffes, hervorruft. *Friedberger* und *Oshikawa* [2], ferner *Friedberger* und verschiedene Mitarbeiter [3] haben auf Grund mehrerer Versuchsserien für die Stichhaltigkeit der Ansicht Pfeiffers Stellung genommen und festgestellt, dass wenn das Antigen, der spezifische Reiz, einmal gewirkt und die Sekretion des spezifischen Abwehrstoffes ausgelöst hat, diese Sekretion auch nach Entfernung des Antigendepots weiter vonstatten geht. Laut Friedberger wirkt die Entfernung des Antigendepots auf die Abwehrstoffbildung sogar fördernd und hindert diese auf keinen Fall.

Reitler [4] hat im Anschluss an die angeführten Arbeiten die Versuchsbedingungen noch weiter verschärft, indem er die als Antigen angewendete Bakteriensuspension subkutan in die Spitze eines Kaninchenohres injizierte, das mittels eines Gummibandes bis zur Stauung abgeschnürt worden war; 3—20 Sekunden nach der Injektion durchtrennte er sodann das Ohr zwischen dem Gummiband und dem Kopf. Unter solchen Bedingungen ging die Agglutininbildung auch vor sich, obwohl mittels verschiedener Kontrollversuche festgestellt werden konnte, dass aus dem Ohr kein Antigen in den Kreislauf gelangte. Auf Grund des Beobachteten folgerte Reitler, dass auf die Wirkung des Antigenreizes der in den perzipierenden Zellen entstehende Reizeffekt weitergeleitet wird und dass es sich bei der Immunkörperbildung letzten Endes um einen Prozess handelt, der seiner Natur nach ein Reflex ist.

Wahrscheinlich ist es dieser letzteren Feststellung zuzuschreiben, dass in den letzten 2—3 Jahren zahlreiche ungarische und ausländische Arbeiten Reitlers Versuche zum Beweis dessen anführen, wie eng die Verbindung zwischen dem Nervensystem und den Immuntitätsphänomenen ist. Jene Autoren, die ohne Kritik zitieren, erkennen nämlich nicht, dass nach den mit Anaesthetika durchgeführten Versuchen Reitlers der durch das Antigen ausgelöste Reizeffekt »nicht durch das bisher als einziger Reizleiter bekannte Nervensystem«

weitergeleitet wird, sondern dass ein Gewebe, das kein Nervengewebe ist — laut Reitler die Haut, das subkutane Bindegewebe, wahrscheinlich aber auch jedes andere Körpergewebe — über die Fähigkeit verfügt, Reize weiterzuleiten und zu unterscheiden; dies manifestiert sich letzten Endes in spezifischer Immunkörperbildung. Reitler stellte fest, dass eine jede Zelle fähig ist, bestimmte lebenswichtige Funktionen — wie die Infektionsabwehr — zu versorgen. Folglich soll nach Reitler die Abwehrstoffbildung ein reflexartiger Prozess sein, der ohne Teilnahme des Nervensystems vonstatten geht.

Unserer Meinung nach ist diese ausgesprochen antinervistische Schlussfolgerung nur auf unrichtig durchgeführte Versuche zurückzuführen, weshalb wir es für notwendig hielten, die Frage erneut und von dem Gesichtspunkt aus zu untersuchen, ob bei der Reitlerschen Technik das Eindringen des Antigens in den Blutkreislauf wirklich ausgeschlossen werden könne. Bei unseren Versuchen gingen wir derart vor, dass wir der als Antigen angewendeten Typhusvakzine mit RaE markiertes Bi_2S_3-Kolloid beimengten, dessen Aktivität zwischen 1,8 und 4,2 Microcurie schwankte, und dessen Grössenordnung auf Grund der in der Virus-Abteilung des Staatlichen Institutes für Volksgesundheitswesen durchgeführten Messungen mit der Ultrazentrifuge sich als zwischen 10 und 100 Millimikron erwiesen hat — doch wurden ansehnliche Mengen von Kolloidteilchen auch unter 10 Millimikron gefunden. Das Gemenge injizierten wir subkutan in die Spitze eines Kaninchenohres, das vorher mit einem Gummiband abgeschnürt worden war. 3—10 Sekunden nach der Injektion amputierten wir das Ohr und kauterisierten die Wunde. Nach 5 Minuten nahmen wir zur Isotopbestimmung und für die Agglutinationsreaktion 12 ml Blut ab. Nach 7—8 Tagen wiederholten wir den ganzen Versuch auf ähnliche Weise am anderen Ohr. Nach weiteren 7—10 Tagen nahmen wir dem Tier zur Agglutininbestimmung weitere 2 ml Blut ab. Für die Versuche haben wir nur solche Kaninchen verwendet, deren normaler Agglutinintiter der angewendeten Typhusvakzine gegenüber vor dem Versuch die Verdünnung 1 : 2 nicht überstiegen hatte. Unsere Ergebnisse haben wir in einer Tabelle zusammengefasst.

Wie zu ersehen, war von unseren 8 Versuchstieren bei den in der Tabelle gezeigten 6 Kaninchen Agglutininbildung nachzuweisen. Die Titer sind zwar ziemlich niedrig — bei einer Verdünnung von 1 : 10 agglutinierte das Serum von 2 Tieren, bei Verdünnungen von 1 : 20, 1 : 80, 1 : 160 und 1 : 320 das Serum von je einem Tier — gleichzeitig war jedoch bei jedem der Tiere festzustellen, dass das dem Antigen beigemischte Bi_2S_3-Kolloid in den Blutkreislauf gelangt war. Der Bi-Gehalt der Blutprobe wurde — unter Voraussetzung gleichmässiger Verteilung — auf die berechnete Gesamtblutmenge der Kaninchen bezogen; auf diese Art konnten wir uns ein Bild schaffen, wie viele Promille des injizierten Kolloides resorbiert worden waren; wie zu ersehen, kann man im allgemeinen damit rechnen, dass 0,5—10‰ des injizierten Kolloides ins Blut gelangt. Es besteht kein regulärer Zusammenhang zwischen der resorbierten Kolloid-

TABELLE

Kaninchen Nr.	Gewicht in g	Zeitpunkt des Versuches	Zwischen dem Zeitpunkt der Amputation des Ohres und dem der Injektion verstrichene Zeitspanne (sec)	Menge von mit Ra E markiertem Bi: Injiziert ml	Injiziert µg	Gefunden µg/10 ml Blut	Auf die Gesamtblutmenge berechnete µg	Resorbiertes Bi ‰	Ty Impfstoff Einspritzung ml	Ty Impfstoff Einspritzung Keim in Millionen	Agglutinintiter
1.	3500	52. XI. 13.	15	2	276	0,067 ± 3,3%	1,541	**5,5**	1	500	0
		20.	10	1	690*	—	—	—	1	500	1 : 160
		XII. 3.									1 : 320
2.	3850	52. XI. 20.	5	0,3	207*	—	—	—	0,3	150	0
		29.	3	0,2	33	0,0007	0,021	**0,6**	0,3	150	1 : 20
		XII. 11.									1 : 20
3.	3550	52. XI. 20.	5	0,2	138*	—	—	—	0,3	150	0
		29.	5	0,3	49,5	0,003	0,081	**1,6**	0,3	150	1 : 10
		XII. 11.									1 : 10
4.	2750	52. XII. 10.	3	0,3	41,7	0,015 ± 30%	0,310	**7**	0,3	150	0
		16.	3	0,15	36,7	0,009 ± 3%	0,185	**5**	0,2	100	0
		23.									1 : 80
5.	2650	53. II. 11.	3	0,5**	—	—	—	—	0,5	250	0
		19.	3	0,35	49,4	0,0034 ± 23%	0,068	**1,4**	0,7	350	0
		III. 7.									1 : 10
6.	3600	53. V. 12.	5	0,5	104,2	0,002 ± 40%	0,050	**0,5**	0,5	250	0
		20.	5	0,3	60,5	0,020 ± 32%	0,600	**10**	0,5	250	1 : 160
		27.									1 : 160

*In den mit * bezeichneten Versuchen wurde Bi-lactat injiziert, das infolge Hydrolysierung zur Resorption ungeeignet wurde.

** Bei dem mit ** bezeichneten Versuch erfolgte wegen Reparation des Zählapparates keine Bestimmung.

menge und dem Titer der gebildetenen Agglutinine, da beim ersten Kaninchen neben einer Resorption von 5,5‰ der Titer 1 : 320 betrug, während neben der etwa gleichen Resorption beim vierten Kaninchen der Titer 1 : 80 war und bei dem weit weniger resorbierenden sechsten Kaninchen 1 : 160 ausmachte. Bei den in der Tabelle nicht gezeigten weiteren 2 Kaninchen war das Isotop im Blut gleichfalls immer nachweisbar, die Resorption war von ähnlichem Masse, Agglutinine wurden jedoch nicht gebildet. Dieser Umstand ist überhaupt nicht als unerwartet zu bezeichnen, da wir doch bei weit massiveren Immunisierungsverfahren unter unseren Kaninchen refraktäre Tiere finden. Im Laufe dieser

Versuche konnten wir feststellen, dass das Gummiband-Verfahren auf keinen Fall eine vollständige Venenstauung hervorrufen kann, wie dies von Reitler angenommen wurde. Der im Ohr des Kaninchens befindliche Knorpel biegt sich nämlich unter dem Druck des Bandes in Bogenform, und wie immer wir auch das Gummiband anlegen, schmiegt dieses sich nicht fest an die ganze Ohrfläche, und ein bedeutender Teil der inneren oder der äusseren Ohrfläche bleibt unabgeschnürt. Eben deshalb schnürten wir bei 4 weiteren Kaninchen das Ohr mit einer mit Gummi versehenen Arterienklemme ab und behielten im übrigen die Versuchsmethodik in unveränderter Weise bei. Bei keinem einzigen Tier war das Isotop im Blut nachweisbar, auch haben wir keine Agglutininbildung beobachtet.

Unsere Versuchsergebnisse stimmten also mit den Daten Reitlers nicht überein : eine spezifische Abwehrstoffbildung konnten wir nur dann feststellen, wenn auf Grund des Verhaltens des Bi_2S_3 auch die Resorption des Antigens anzunehmen war. Unsere Ergebnisse bekräftigen also die Versuche von *Dölter* und *Kleinschmidt* [5] sowie *Cohn* [6], die auf weniger exakte Weise gleichfalls zu der Folgerung gekommen sind, dass es zur Bildung von Abwehrstoffen unumgänglich notwendig sei, dass das Antigen ins Blut gelange.

Reitler wandte sogar eine zweifache Kontrolle an, um sich davon zu überzeugen, dass neben der gegebenen Technik kein Antigen in den Kreislauf gelangen konnte. Einerseits injizierte er in die Spitze des abgeschnürten Ohres statt Antigen lebende Anthraxbakterien, deren Virulenz durch Kaninchen-Passage stark gesteigert worden war ; nach der nach 10 Sekunden erfolgten Amputation des Ohres waren die Kaninchen am Leben geblieben. Diese Kontrolle ist inadäquat, da es zur Bildung von Abwehrstoffen nicht notwendig ist, dass lebende, ganze Bakterienzellen in den Kreislauf gelangen und es durch *Noetzels* [7] Versuche bekannt ist, dass Kaninchen rein intravenös eine Menge von Anthraxbakterien vertragen, die bei subkutaner Impfung tödlich ist. Die Reitlersche Technik ist aber ein Schulbeispiel für die rein intravenöse Injektion.

In seinem anderen Kontrollversuch injizierte Reitler 0,2 ml 10%ige KCN-Lösung unter ähnlichen Bedingungen und schnitt das Ohr nach der Injektion sofort ab ; die Kaninchen blieben am Leben. Nehmen wir nun an, dass vom KCN bis zum Zeitpunkt der Amputation 1% der eingegebenen Menge resorbiert worden ist, so gelangte ins Blut der Kaninchen, deren Gewicht nicht angeführt wird, 200 Mikrogramm KCN. Diese Menge ist jedoch viel weniger als die minimale letale Dosis, denn es ist aus *Gepperts* [8], ferner *Heymans* und *Masoins* [9] Versuchen bekannt, dass die minimale letale Dosis von KCN bei Kaninchen nach intravenöser Verabreichung 400 Mikrogramm/Kg beträgt. Unseren eigenen Versuchen zufolge betrug die geringste i. v. verabreichte letale Dosis von KCN 600 Mikrogramm, d. h. 1,8 mg bei einem Kaninchen von 3000 g Gewicht.

Die Schlussfolgerung, die sich daher aus unseren bisherigen Versuchen ergibt, ist die, dass Reitler infolge inadäquater und fehlerhafter Kontrollen zu unrichtigen Feststellungen gelangt ist. Die Reitlersche Technik ist von Grund aus nicht geeignet zu entscheiden, ob das Antigen spezifische Reizeffekte ausübt und Prozesse reflexartiger Natur auslöst. Im Zusammenhang hiermit müssen wir, auf Grund unserer biologischen Kenntnisse über die Reizleitung mit und ohne Dekrement, auch jene Folgerung Reitlers zurückweisen, laut welcher bei höheren Organismen der durch das Antigen hervorgerufene Reizeffekt nicht durch das Nervengewebe, sondern auf anderen Wege zu den abwehrstofferzeugenden Effektoren weitergeleitet wird. Unsere Versuche scheinen zu beweisen, dass 3—10 Sekunden hindurch dauernde Antigenreize an sich spezifische Abwehrstoffbildung nur dann hervorrufen, wenn minimale Antigenmengen in den Kreislauf gelangen und dort dauernde Reizwirkungen ausüben können. Zur Feststellung dessen, welche Rolle das Nervensystem bei der Perzeption und Leitung der Antigenreize spielt, sind unsere mit verlässlicher Technik durchgeführten Versuche derzeit im Gange.

Auch an dieser Stelle danken wir Dr. A. Havas, Oberdirektor des Staatl. Instituts für Volksgesundheitswesen, und Gy. Takátsy, stellvertretendem Abteilungsleiter, die die Messungen der Kolloidteilchen zu ermöglichen bzw. auszuführen freundlich waren.

ZUSAMMENFASSUNG

Nach Reitlers oft zitierten Versuchen lösen Darmbakterien, wenn sie in die Spitze eines mit Gummibändern abgeschnürten Kaninchenohrs subkutan injiziert werden, trotz der nach 3—10 Sekunden erfolgenden Amputation des Ohres, die Bildung von spezifischen agglutinierenden und komplementbindenden Antikörpern aus. Auf Grund dieser Versuchsergebnisse hat Reitler angenommen, dass die Immunkörperbildung ein Reflexprozess sei, bei dem aber der durch einen kurzen Antigenreiz zustande gekommene Reizeffekt nicht durch das Nervensystem, sondern durch Gewebezellen weitergeleitet wird. Bei unseren Kontrollversuchen mengten wir unter den von Reitler angegebenen Versuchsbedingungen der als Antigen verwendeten Typhusvakzine radioaktives Wismuthisotop bei und führten 5 Minuten nach Amputation des Ohres eine Isotopbestimmung im Blute der Kaninchen durch. Unsere Ergebnisse beweisen durchwegs, dass im Blute von auf solche Art behandelten Tieren spezifische Agglutinine nachzuweisen sind, gleichzeitig aber auch immer das Isotop erscheint. Änderten wir unsere Versuche in der Weise, dass das Ohr anstatt mit einem Gummiband durch eine mit Gummi versehene Arterienklemme abgeschnürt wurde, so erfolgte keine Agglutininbildung und auch das Isotop gelangte nicht ins Blut. Unseren Versuchen zufolge lösen also 3—10 Sekunden lang wirkende Antigenreize nur dann spezifische Abwehrstoffbildung aus, wenn minimale Antigenmengen in den Kreislauf gelangen.

LITERATUR

1. *Pfeiffer, R.:* Mode d'action et origine des substances actives des serums préventivs et des serums antitoxiques. Ber. d. XIII. Intern. Kongr. f. Hyg. Brüssel 1903.

2. *Friedberger, E.* und *Oshikawa, K.:* Ztschr. f. Immunforsch. **33**, 306 (1922).

3. *Friedberger, E.* und *Tinti, M.:* Ztschr. f. Immunforsch. **39**, 452 (1924). — *Friedberger, E.* und *Huang, D.:* Ztschr. f. Immunforsch. **39**, 459 (1924). — *Friedberger, E.* und *Torii, T.:* Ztschr. f. Immunforsch. **39**, 462 (1924).

4. *Reitler, R.:* Wien. Klin. Wschr. **38**, 267 (1924) — Ztschr. f. Immunforsch. **44**, 511 (1925).
5. *Dölter, W.* und *Kleinschmidt, K.:* Ztschr. f. Immunforsch. **44**, 531 (1925).
6. *Cohn, H.:* Ztschr. f. Hyg. **106**, 209 (1926).
7. *Noetzel, H.:* Arch. f. Klin. Chir. **57**, 396 (1898).
8. *Geppert, J.:* Ztschr. f. Klin. Med. **15**, 208 (1889).
9. *Heymans, J. F.* und *Masoin, F.:* Arch. de Pharmacodyn **3**, 359 (1897).

НЕРВНАЯ СИСТЕМА И ИММУНИТЕТ. СООБЩЕНИЕ II. МОГУТ ЛИ ОБРАЗОВЫВАТЬСЯ СПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРИ НЕСКОЛЬКОСЕКУНДНОМ ДЕЙСТВИИ АНТИГЕННОГО РАЗДРАЖЕНИЯ?

Л. Кестьюш, Ш. Салаи, Л. Кочар, Л. Кертес и Я. Шаланки

Р е з ю м е

Р е й т л е р в связи с этим вопросом сообщает следующее: если после подкожного введения тифозных бактерий кроликам в верхнюю часть ушей, зажатых резиновой лентой, через 5—10 секунд уши были ампутированы проксимально от ленты, то неделю спустя в крови животных появились специфические агглютинирующие и связывающие комплемент антитела. На основании этих результатов Р е й т л е р предполагал, что образование иммунных тел является рефлекторным процессом, в котором однако возбуждение, возникшее от кратковременного антигенного раздражения, проводится не через нервную систему, а через другие тканевые клетки. В наших контрольных опытах — при указанных Р е й т л е р о м условиях — к служащей антигеном тифозной вакцине мы примешали радиоактивные изотопы висмута, и после ампутации уха через 5 минут произвели определение изотопов в крови кроликов. Одну неделю спустя установили титр агглютининов и провели такой же опыт на другом ухе того же самого животного. Результаты обоих опытов показали, что в крови протерпе_ших такой опыт животных имеется наличие специфических агглютининов, но одновременно с ними появляется в крови и изотоп. Если уши подопытных животных вместо резиновой ленты зажимали снабженным резиной пеаном, то агглютинины не появлялись, но и изотоп не проникал в кровь. На основании проведенных опытов можно установить, что 3—10-ти секундное антигенное раздражение только в том случае вызывает образование специфичных антител, если минимальное количество антигена проникло в кровообращение.

STUDIES IN HAEMOLYTIC DISEASE OF THE NEWBORN

By
R. BACKHAUSZ and G. NEUBAUER

»Human« Institute for Production and Research of Serobacteriological Preparations and 1st Dept. of Gynaecology, Medical University, Budapest

Received, August 31, 1953

The first author to direct attention to the incompatibility of blood groups of mother and child was the Hungarian *Lénárt* [1], as early as 1928. When 12 years later *Landsteiner* and *Wiener* [2] discovered the rhesus (Rh) factor, this was found to have a predominant aetiological role in the haemolytic disease of the newborn.

Subsequent investigations [3] revealed that the Rh factor is not uniform but that there exists a rhesus blood group system, the antigen pairs of which are usually designated with the letters C, D, E and c, d, e, as suggested by *Fisher* [4]. In the majority of the cases iso-immunization is caused by the factor D but the antigens of the A-B-O blood group system, as well as other, recently described blood group antigens (*Kell* [5], *Lutheran* [6], *Lewis* [7], etc.), may also be involved.

To our present knowledge [8, 9, 10, 11, 12], haemolytic disease develops when foetal antigens enter through the placenta the maternal organism, causing there production of antibodies which, on their turn, pass back *via* the placenta and haemolyze the foetus' red corpuscles.

In case of iso-immunization during pregnancy the prognosis of the foetus may take one of the following courses.

(I) Still-birth, with or without hydrops

(II) Living babies with a) Kernicterus
b) icterus gravis
c) erythroblastic anaemia of a minor or major degree

(III) Living babies without any lesion.

Antibodies formed in consequence of iso-immunization fall into two groups.

(I) Saline agglutinins (synonyms : complete agglutinins, bivalent or early antibodies) capable of agglutinating homologous erythrocytes both in saline and protein media [13].

(II) Albumin agglutinins (synonyms : glutinins, incomplete, blocking, late, mature, hyperimmune, univalent antibodies) agglutinating only in media containing albumin, although bound into erythrocytes also in saline media.

Serological methods are undoubtedly of great significance in diagnosis, prognosis and therapy, but opinions vary as to their evaluation, it seemed therefore justified to work up our material with due regard to the eventual correlations between serological findings and clinical picture. A total of 96 cases, originating partly from the 1st Dept. of Gynaecology of Budapest Medical University partly from material sent in from other sources, were subjected to examinations.

In the course of years we have employed various methods of investigation. Owing to this the elaborated material is not quite uniform.

Methods

1. *Determination of blood groups.* In the A—B—O system anti-A and anti-B sera of a high (at least 1 : 64) titre prepared by us were used in slide test determinations. In adults, the reliability of tests was increased by checking also iso-agglutinins in the sera. (In newborn and young infants natural agglutinins do not occur.) Within the Rh blood group system the D factor was determined in every case. The serum used for this purpose was prepared by the following method [14/a]. 100 to 200 ml of citrated, homologous A—B—O group, D positive blood were transfused into normal, D negative men. After an interval of 4 to 6 weeks 3 to 9 microtransfusions were given in 2 to 3 day intervals, injecting on each occasion 0,5 ml of blood, as specified above. When anti-D antibodies appeared, 200 to 500 ml of blood were taken from each subject and the iso-agglutinins were absorbed with sedimentated homologous, D negative erythrocytes. If anti-C antibodies were also present, the serum was subjected to absorption with erythrocytes of the Cde/cde type. The sera so obtained were preserved with merthiolate 1 : 10 000 and filtered through a Seitz filter. Our anti-D sera were mostly of the albumin-agglutinating type, with a titre varying between at least 1 : 64 and 1 : 4000. D factor determination was usually made with *Diamond*'s [14/b] slide test method. If the blood so tested proved to be D-negative, the examination was repeated in a humid chamber at 37° C.

In certain cases the bloods were tested also for C, c, and E types, with sera obtained from the »Certified Blood Donor Service«.

Blood types M and N were determined by the slide-test method, with hyperimmune sera produced in rabbits and subjected to adequate absorption.

2. *Examination of the antibodies.* The sera to be tested for titres to anti-A and anti-B antibodies were examined in double dilution series prepared with an isotonic phosphate puffer adjusted to pH 7,3. To each dilution equal volumes of a 2 per cent erythrocyte suspension of the A or B type were added and the results were read after 4 hours of incubation at room temperature. If iso-immunization within the A—B—O system was suspected, tests were carried out (in albumin medium) in human serum containing no irregular agglutinins.

Anti-D and other irregular antibodies were examined in saline and albumin media, partly by the tube method, partly with the slide test. The latter method was modified by using a wet chamber of 37°C for 15 minutes. In our experience this method was suitable also for titre determinations. The avidity of antibodies i. e. the time required for complete agglutination at room temperature, was also determined by the slide test.

In doubtful cases both *Coombs*' reaction and examination of the cytotropic effect of sera [15] proved to be of value.

3. *Biological reactivation test.* The biological reactivation test recommended by Bessis [16] was carried out as follows. In intervals of 2 to 3 days doses of 0,5 ml of D-positive, A—B—O homologous blood were transfused into the D-negative woman. The antibody titres were repeatedly determined following the last injection. Although we used to apply this test for establishing whether or not iso-immunization had occurred in previous pregnancies, it cannot be recommended owing to the inherent danger of hyperimmunization.

4. *Coombs' reaction.* The anti-human globulin serum required for the tests introduced by *Coombs, Mourant and Race* [17] was produced in rabbits. Human blood serum precipitated with $K_2Al_2(SO_4)_4$ was washed with saline, and preserved with merthiolate in a dilution of 1 : 10.000. With an interval of four weeks two doses of 10 ml each were administered intramuscularly to rabbits. 2 to 4 weeks following the second injection the rabbit blood sera precipitated human proteins at least with a titre of 1 : 10.000. The rabbit serum obtained was absorbed with washed erythrocytes of the A-, B-, O- and AB, D-positive and D-negative, M and N types. The sera so treated agglutin-

ated sensitized human erythrocytes on the test-slide usually immediately, or at most within 5 minutes.

Coombs' indirect reaction was performed in the following way. The serum to be tested was mixed with an equal volume of a 2 per cent suspension of test erythrocytes. After 1 hour of incubation at 37°C the erythrocytes were washed three times with saline and brought together with anti-human-globulin serum on a test plate. Anti-D sera of higher titre gave a positive reaction even when the incubation period had been of only a few minutes' duration.

5. *Clinical application.* Rh typing of pregnant women was performed as a routine examination. In D-negative cases the husband's blood group was also typed. If the latter proved to be D-positive, the blood serum from the wife was tested for anti-D antibodies by the method described above. These tests were repeated several times during pregnancy. Special attention was paid to cases where intrauterine death, hydrops, icterus gravis, erythroblastic anaemia or kernicterus were revealed in the history. In a few cases induction of premature labor or Caesarian section were performed in order to prevent further damage to the foetus.

Umbilical blood from newborns has been subjected to the following tests : blood group typing, *Coombs'* reaction, quantitative and differential blood cell count, serum bilirubin estimation.

Results

1. *Antigens provoking iso-immunization during pregnancy*

Of the 96 cases with serological evidence of iso-immunization during pregnancy or with a foetus doubtlessly suffering from haemolytic disease, iso-immunization occurred within the rhesus group in 83 cases (86,5 per cent) (Table I). Out of

TABLE I

Antigens inducing iso-immunization during pregnancy

Antigen	Number of cases	Per cent
D	82	85
E	1	1
A	8	8
B	3	3
Unknown	2	2
Total	96	

these, in one case factor-E and in 82 cases factor-D acted as antigen. In two of the latter cases we failed to detect anti-D antibodies in the blood of the mother. Both infants died of kernicterus. Of the remaining 80 cases attempts have been made in 41 to determine whether along with the D-factor also some other antigen or antigens had a role in the development of iso-immunization. In 29 cases, i. e. in two-thirds of the cases tested, only anti-D antibodies were detectable, while of the remaining 12 cases in 10 anti-C, in one anti-E and in another one

high-titre immune anti-A antibodies could be demonstrated along with the anti-D antibody.

In 11 cases (11,4 per cent) was iso-immunization found within the A-B-O group. In 8 cases anti-A and in 3 cases anti-B antibodies were responsible for the foetal lesion.

In one case of twins the antigen elicting iso-immunization could not be identified. Although the clinical diagnosis of kernicterus was doubtless, all attempts had failed to detect irregular antibodies in the maternal blood serum. Neither could we detect any incompatibility between mother and twins either within the A-B-O, or within the Rh system.

In another case the blood serum of the mother proved to contain irregular antibodies, but we have failed to determine their specificity.

In our material the incidence of lesions caused by the D factor was 5 to 8 per cent lower than the average in foreign countries. On the other hand, iso-immunization within the A-B-O system occurred in higher proportions.

2. *Iso-immunization and number of pregnancies*

The relation between iso-immunization or foetal damage and the number of pregnancies has been studied in 77 women (Table II). The rest of the cases

TABLE II

Iso-immunization and number of pregnancies

Number of pregnancies	Number of cases	Per cent
1.	18	23
2.	36	47
3.	11	14
4.	8	10
5.	2	3
6—9.	2	3
Total	77	

could not be included in this series, owing to lack of data in the history. In 18 cases did haemolytic disease respectively iso-immunization during pregnancy occur during *the first pregnancy* already. In 8 of these cases had the mother previously received a blood transfusion. In one case, in spite of the presence of maternal anti-D agglutinins, the infant was not damaged, presumably because antibodies had been formed only at the end of the pregnancy. In the remaining 9 cases foetal damage occurred in the first pregnancy already. The possible explanation for this is to be sought in a transfusion received by the

mother in her infancy or childhood, or in unrevealed abortions. The incidence of iso-immunization was much higher *in second pregnancies* (36 cases). Out of these in 24 cases had had a mature, normal sibling in the first pregnancy. Abortion preceded the second pregnancy in 7 cases, while in 5 cases a blood transfusion had been administered between the first and second pregnancies. In 11 cases iso-immunization or foetal damage occurred *in the third pregnancy*. In one of them a normal child was born, although the blood serum of the mother contained unidentified irregular antibodies. Previous abortion was mentioned in the history of 2 cases, and blood transfusion in one case.

The first evidence of haemolytic disease of the newborn appeared 8 times in the *4th pregnancy*, twice in the *5th pregnancy*, once in the *6th* and once in the *9th pregnancy*. Thus, of the 75 mothers in 8 exclusively, and in 5 presumably, transfusion of D-positive blood was responsible for the initiation of irregular antibody production. Indicative of the sensitizing effect of abortions is the fact that in 8 cases the first pregnancy with foetal damage had been preceded only by abortions.

3. *Relation between foetal lesion and quality of maternal anti-D agglutinins*

The correlation between the prognosis of the foetus and the type and the titre of maternal antibodies has been studied in 89 cases. In a considerable part of these cases the antibody content of the maternal serum was observed both during pregnancy and in puerperium. The data given represent the highest titres obtained.

From the data in Table III the following conclusions can be drawn.

a.) In one case no foetal injury occurred in spite of the fact that iso-immunization had developed during pregnancy. This was attributed to the fact that in the maternal serum antibodies were detected only in the last months of pregnancy and even then they attained low titres only.

b.) Ten pregnancies have been observed, in which the mother was D-negative and the father D-positive. Of the former pregnancies of these women D-positive infants with haemolytic disease had been born while from the present pregnancies normal, D-negative babies, who needed no treatment at all. In only 2 of these 10 pregnancies could we not detect anti-D agglutinins ; in the other 8 cases there were D-agglutinins present, but in four cases the highest titre was 1 : 8 and in no cases did it exceed 1 : 64. The titres were higher during pregnancy than in the puerperium. In these 8 cases anti-D agglutinins were formed in consequence of an anamnestic reaction. This shows that antibody formation during pregnancy is not necessarily indicative of foetal injury.

c.) On comparing the deleterious effect of saline agglutinins to that of albumin agglutinins, it is found that in our material albumin agglutinins caused foetal injury in a higher proportion (in 57 cases) than saline agglutinins

TABLE III

Relationship of type and titre of maternal anti-D antibodies to prognosis, as determined in 89 pregnancies

Anti-D antibodies		Number of children from				
		compatible pregnancies without lesion	incompatible pregnancies			
			without lesion	with		
type	titre			icterus gravis**	kernicterus	stillbirths
Saline	0	2*	0	0	3	0
	1 : 2—1 : 8	1	1	5	0	0
	1 : 16—1 : 64	2	0	5	0	1
	1 : 128—1 : 512	0	0	4	0	1
	1 : 1024 or higher	0	0	2	0	0
Albumin	1 : 2—1 : 8	3	0	7	2	2
	1 : 16—1 : 64	2	0	10	1	8
	1 : 128—1 : 512	0	0	16	0	9
	1 : 1024 or higher	0	0	1	0	1

* In the serum of the D-negative mothers anti-D antibodies had been detected in earlier incompatible pregnancies.

** Including infants born with erythroblastic anaemia.

(18 cases). It is also noteworthy that while kernicterus was caused by saline agglutinins in none of the cases and intrauterine death only in one case, albumin agglutinins gave rise to kernicterus in 3 cases and to intrauterine death in 20 cases. Formation of saline agglutinins into albumin agglutinins could be observed in 5 mothers. In these cases saline agglutinins were usually present during pregnancy, while in the childbed albumin agglutinins could be demonstrated. The latter cases have been included into the saline agglutinin group. The reverse of this phenomenon, i. e. the conversion of albumin agglutinins into saline type ones was observed neither in pregnant women, nor in any of the male donors involved in anti-D serum production.

d.) In cases of intrauterine death or icterus gravis the titre of maternal anti-D agglutinins was mostly higher than 1 : 64, but in some cases it was as low as 1 : 2 to 1 : 8. Thus, with a maternal antibody titre of 1 : 128 or higher damage to the foetus seems to be probable. Still, the possibility of a lesion is not excluded by lower titres.

e.) It is remarkable that from among the cases where the infants of D-negative mothers died with kernicterus no antibodies were detectable in 3, a titre as low as 1 : 8 was found in 2 cases while in one case titre was between 1 : 16 and 1 : 64.

These findings confirm the data according to which kernicterus may develop also in the absence of maternal iso-immunization [18], particularly in premature infants.

f.) The highest titres of maternal antibodies were found during the third week after delivery. Values obtained at that time usually showed correlation with the titres observed during pregnancy. The highest saline agglutinin titre found, 1 : 8000, occurred in a case of icterus gravis, while the highest albumin agglutinin titre (1 : 2000) in a case of foetal hydrops.

4. *Foetal injury in cases of maternal iso-immunization against A, B, and E antigens*

Considering, that in contrast with the antibodies of the rhesus group, anti-A and anti-B agglutinins are constantly present also in the serum of normal adults, the problem of iso-immunization within the ABO blood group was approached on the basis of the clinical picture. Examinations on 11 such mothers are discussed below. We had the opportunity of observing two pregnancies each in 3 of these cases. In one case a mother of the O group gave birth first to an A-group foetus with hydrops, then to a normal A-group infant. In the other case an A-group mother had first a B-group foetus with hydrops and then a B-group baby that died immediately after birth. In the third case an O-group mother had first an A-group infant with kernicterus and next time an A-group infant with icterus gravis.

Thus, the 14 pregnancies of the 11 mothers under discussion ended with the following result,

2 hydrops foetalis
1 death immediately following birth
4 kernicterus
6 icterus gravis
1 normal child.

These data apart from illustrating the serious consequences of iso-immunization, call the attention to the fact that one must be very careful when making statements as to the probable outcome of pregnancies following foetal injury since not all successive pregnancies will result in an equally damaged infant [19].

In part of the material the secretory type of the parents and the newborn was also tested. One of the live-born, damaged babies was non-secretory, all of the rest were of the secretory type.

Opinions vary as to the role of the secretory type in iso-immunization within the ABO group. According to some authors (*Bettis, Gyöngyössy* [20]), in foetus possessing secretory properties only milder lesions would develop, considering that the blood group antigens present in the body fluids of such foetus bind the maternal anti-A or anti-B iso-agglutinins and offer thereby

protection to the foetal erythrocytes. On the other hand, Schmidt [21] has claimed that blood group antigens of foetus of the secretory type, passing more readily through the placenta than those of non-secretory foetus, are capable of causing a higher rise in the titre of maternal antibodies.

When studying the distribution of blood groups among immunized mothers it was found that 10 mothers belonged to group O and only one to group A. Considering that in Hungary the incidence of group O amounts to 30 per cent [22], it may be assumed that the relatively high number of O-group mothers in our material would be due to their being more readily immunizable with A or B group antigens than mothers of the A or B group. In 8 mothers the antibodies were against A-group foetus and in 3 against B-group foetus. Nine of the mothers were D-positive and 2 were D-negative. Of the latter one gave birth to a D-negative infant, while in the other case no anti-D agglutinins could be detected, in spite of the fact that the baby proved to be D-positive.

Except 3 cases, maternal sera were titrated for iso-aglutinins only in puerperium, by bringing together the serum of the mother with suspended erythrocytes of the same blood group as that of the foetus. The following deviations from normal have been observed.

a.) While the usual titre for iso-agglutinins varies between 1 : 2 and 1 : 512, in 7 cases titres of 1 : 512 or higher were found. Among these one was 1 : 4000 and another 1 : 8000.

b.) In 3 of the above 7 cases the antibody titre proved to be 2 to 16 times higher when determined in albumin medium than the one obtained in saline medium. In 4 cases this phenomenon did not occur.

c.) The tests being carried out with non-inactivated serum, in lower dilutions (1 : 2, — 1 : 16, 1 : 32) agglutination was only slight or totally absent. This pre-zone phenomenon which was usually observable for 3 to 4 days after withdrawal of blood, and which, gradually diminishing, disappeared on the 7th to 8th day, occurred only in much lower dilutions (1 : 2, occassionally 1 : 4) with the serum of non-iso-immunized adults.

d.) Fresh, non-inactivated maternal sera haemolyzed heterologous erythrocytes belonging to the same blood group as the foetus in dilutions of 1 : 4 to 1 : 8. This activity was reduced to 1 : 2 by the 6th day and was usually abolished on the 8th day. No haemolysis could be achieved by adding guinea pig complement to sera inactivated during storage.

e.) In 5 cases the maternal sera showed a titre as low as 1 : 32 to 1 : 128. The pre-zone phenomenon and the increase of haemolyzing capacity could be observed also in such cases.

f.) Dilutions of maternal sera brought together with red cellas of the foetus *in vitro* give rise sometimes to no haemolysis or pre-zone phenomenon. In order to elucidate this finding, further examinations are carried out.

g.) In O-group maternal sera the anti-A titre in the case of a B-group foetus, or the anti-B titre in the case of an A group foetus never exceeded normal values. The lowest titre was 1 : 16, the highest 1 : 256. Both pre-zone phenomenon and haemolysis were considerably less marked.

Anti-E antibodies could be detected in one case only, in a D-positive, C-positive, E-negative maternal serum. The newborn was D-positive and E-positive. The icterus gravis, that had developed, was successfully treated with transfusion of D-negative, E-negative blood.

Irregular antibodies of unidentified specificity were detected in one case, in the serum of a B-group cde/cde type mother. Her serum agglutinated 2 of 30 bloods at a dilution of 1 : 2. The antibody showed no correlation with the Rh, A-B-O or MN blood group systems. Agglutination was observable even at 37° C. The infant born from the third pregnancy showed no signs of haemolytic disease.

5. *Use of the biological reactivation test*

The biological reactivation test was carried out in 4 cases in mothers who had shown low titre anti-D antibodies prior to the micro-transfusions. The titre increased considerably in 3 cases and remained unchanged in 1 case. The test was performed also in 3 non-pregnant D-negative women whose sera contained no anti-D antibodies at the time of examination. In 1 of these 3 cases antibodies appeared after the third micro-transfusion, while in 2 cases no antibodies were formed. The former case of the foetal lesion mentioned in the history could be correlated with iso-immunization during pregnancy, while in the two latter cases, where only abortions were mentioned in the case history, the lesion was probably due to some other factors.

6. *Results with Coombs' reaction*

Blood from 30 newborn infants was subjected to *Coombs'* reaction. The results may be divided into 3 groups.

a.) The reaction was positive in 12 cases. Each mother was D-negative, each newborn D-positive. Anti-D antibodies were detectable in all maternal sera. The blood serum of each infant contained more than 3 mg per 100 ml of bilirubin. In a further untreated case *Coombs'* reaction was positive as late as 8 weeks following parturition, although in other cases during the first post-natal week the reaction became mostly negative.

b.) Ten cases were observed, where D-negative mothers immunized during previous pregnancies gave birth to D-negative children. In all of the above cases the umbilical blood gave a negative *Coombs'* reaction. In none of the cases was there clinical evidence of haemolytic disease.

Thus, in the above 23 cases the correlation between *Coombs'* reaction and foetal injury was well established.

c.) In further 8 cases *Coombs*' reaction was negative, in spite of the fact that the newborns showed clinical symptoms of haemolytic disease. In 4 of these cases there was iso-immunization within the A-B-O system and the reaction was performed in blood taken 3 to 10 days following birth and not in umbilical cord blood.

In one case of D-negative iso-immunization the reaction was carried out as late as on the 10th post-natal day.

In 3 cases the mother was D-negative and the newborn D-positive, but during pregnancy no anti-D agglutinins had been demonstrable in the maternal serum, except in one case in which there had appeared anti-D antibodies at a 1 : 2 titre. *Coombs*' reaction was negative in these cases too ; of the three newborns two showed the symptoms of kernicterus, while one suffered from icterus gravis.

From the above the following conclusions may be drawn. First, *Coombs*' reaction gives reliable results only when performed immediately after parturition. Second, in cases where during pregnancy no anti-D agglutinins are detectable in the maternal serum, *Coombs*' reaction cannot be expected to be positive.

Discussion

The examinations discussed in this paper have yielded evidence showing that for the haemolytic disease of the newborn the D-factor is primarily responsible. In cases where along with the D-antigen also other antigens participate in senzitization, it seems probable that antigens other than D would be responsible for foetal damage only to a reduced extent. Such antigens become demonstrable only after the anti-D antibody titres have reached a certain high level, as it was seen in one of our hyper-immunization experiments not discussed here in detail.

The fact that anti-D antibodies or foetal injury occurred most frequently in second or later pregnancies agrees well with literary data [11, 23, 24, 25]. Our cases show that transfusion of D-positive blood is a more potent antigenic stimulus than pregnancy. Young girls and D-negative females in the age of fertility must therefore never be transfused with D-positive blood.

The sensitizing effect of abortions has been well illustrated by the findings. Artificial abortion in D-negative women should consequently be indicated with exceptional care.

In the management of pregnants it should be borne in mind that foetal injury might occur in the first peregnancy already. In such cases, the prognosis of which is usually favourable, serology is the only aid in diagnosis.

As regards the clinical evaluation of antibody tests carried out during pregnancy, the following may be stated. When the maternal serum contains no anti-D antibodies, injury to the foetus is unusual. With low maternal serum

antibody titres (less than 1 : 64) the prognosis is usually more favourable than with high ones, although deviations from this rule are by no means rare. In our cases where D-negative children were born and an anamnestic reaction was also revealed, maternal antibody titres higher than 1 : 64 did not occur.

Saline-type antibodies are associated with a better prognosis than albumin-type ones. All this, of course, is not of absolute validity, since deviations from these rules were not uncommon in our material either. Albumin agglutinins were detected in about three times as many sera of our material as saline agglutinins. This may have been due to the fact that in the major part of cases the tests were not carried out in the first pregnancy bearing an injured foetus.

In cases of iso-immunization within the A-B-O blood group system the result of serological tests may be variable. Foetal injury may occur not only with high anti-A or anti-B titres, but also with unusually high anti-A or anti-B haemolysin titres and with the pre-zone phenomenon.

From among serological tests for newborn infants, *Coombs'* reaction is thought to be of special significance. In this connection it must be mentioned, as it had been discussed also elsewhere [26], that in 13 of our cases there was an exsanguination transfusion with D-negative blood carried out. In addition to clinical symptoms, the result of *Coombs'* reaction served as basis for the indication.

SUMMARY

1. Serological examinations were made in 96 mothers undergoing immunization during pregnancy or giving birth to infants suffering from haemolytic disease.

2. Iso-immunization during pregnancy was of Rh origin in 83 cases (86,5 per cent), in 82 instances against the D-factor and in 1 instance against the E-factor. In 11 cases (11,4 per cent) was iso-immunization caused by antigens of the A—B—O blood group system. Of these, in 8 cases was the A antigen and in 3 cases the B antigen responsible for immunization. In 1 case the antigen could not be identified, while in another case no iso-immunization could be demonstrated, in spite of the presence of foetal injury.

3. Iso-immunization was most frequent in second pregnancies, although it could also be demonstrated in 18 cases of first pregnancy. In 8 of the latter cases pregnancy had been preceded by blood transfusion.

4. Maternal anti-D agglutinins were of the albumin type in 57 cases and of the saline type in 18 cases. In general, foetal injury due to saline agglutinins was less extensive than that caused by albumin agglutinins. While an antibody titre of 1 : 128 or higher was a realiable indicator of foetal damage, a lower titre does not exclude the possibility of foetal disease. The serological finding is consequently not a conclusive proof of intrauterine lesion.

5. In 10 pregancies anti-D antibodies developed in the course of an anamnestic reactio n, the infants were D-negative, *Coombs'* reaction was negative in 8 cases, the maternal serum gave a titre lower than 1 : 8 and in 2 cases the titres varied between 1 : 16 and 1 : 64.

6. In cases of iso-immunization within the A—B—O blood group system, there occurred a marked rise in the titre for the antibody corresponding to the blood group of the foetus, a prezone phenomenon, and a rise in the haemolysin titre.

7. The biological reactivation test was carried out in 7 women. The test proved to be suitable both for detecting iso-immunization and for producing high-titre sera. It has also been found that micro-transfusions raised the anti-D agglutinin titre more effectively than an incompatible pregnancy.

8. In cases where during pregnancy the maternal serum had contained antibodies, *Coombs'* reaction carried out with umbilical cord blood of the infant yielded results of both prognostic and diagnostic significance. On the other hand, in cases of kernicterus with no anti-D antibodies in the serum of the mother, *Coombs'* reaction was also negative.

LITERATURE

1. *Lénárt, Gy.:* Orvosi Hetilap **72**, 830 (1929).
2. *Landsteiner, K.* and *Wiener, A. S.:* Proc. Soc. exp. Biol. Med. **43**, 223 (1940).
3. *Wiener, A. S.:* Proc. Soc. exp. Biol. Med. **54**, 316 (1943).
4. *Fisher, R. A.* and *Race, R. R.:* Nature **155**, 543 (1945).
5. *Coombs, R. R., Mourant, A. E.* and *Race, R. R.:* Lancet, **1**, 264 (1946).
6. *Callender, Sh. T.* and *Race, R. R.:* Ann. Eugen. **13**, 102 (1946).
7. *Mourant, A. E.:* Nature, **158**, 237 (1946).
8. *Wiener, A. S.:* Blood Groups and Transfusion, 3. ed. Ch. C. Thomas ed. (1943).
9. *Bessis, M.:* La maladie hémolytique du nouveau-né, Masson ed. (1947).
10. *Potter, E. L.:* Rh,... its relation etc. Year Book Publ. (1947).
11. *Gyöngyössy, A.: Némethy, S.* and *Kardos, F.:* Orvosi Hetilap, **91**, 1486 (1950).
12. *Mollison, P. L., Mourant, A. E.* and *Race, R. R.:* The Rh Blood Groups. Med. Res. Counc. Memorand. (1948).
13. *Wiener, A. S., Hurst, G. J.* and *Sonn-Gordon, E. B.:* J. exp. Med. **86**, 267 (1947).
14a *Diamond, K. L.* cit. Bessis (7) p. 247.
14b *Diamond, K. L.* and *Abelson, N. M.:* Jour. lab. and clin. Med. **30**, 668 (1945).
15. *Backhausz, R.* and *Vajda, Gy.:* Kísérletes Orvostud. **3**, 33 (1951).
16. *Bessis, M.:* Revue d Hématol. **1**, 70 (1946).
17. *Coombs, R. R., Mourant, A. E.* and *Race, R. R.:* Brit. Jour. exp. Path. **26**, 255 (1945).
18. *Asher, P.:* Lancet, **259**, 74 (1950).
19. *Révész, K., Vincze, L.* and *Backhausz, R.:* Gyermekgyógyászat, **4**, 221 (1953).
20. *Gyöngyössy, A.:* Debreceni egyet. Női Klin. Közl. p. 155 (1948.)
21. *Schmidt, H.:* Geburtsh. u. Frauenheilk. **12**, 917 (1952).
22. *Backhausz, R., Nemeskéri, J.* and *Vajda, Gy.:* Homo, **1**, 192 (1950).
23. *King, E. L.* and *King, J. A.:* Am. Jour. Obst. Gynec. **59**, 618 (1950).
24. *Etcheverry, M. A.:* Rev. Méd. Ch rurg. **14**, 83 (1946).
25. *Ginsberg, V.* and *Feldmann, F.:* Am. Jour. Obst. Gynec. **59**, 618 (1950).
26. *Neubauer, Gy.* and *Backhausz, R.:* Orvosi Hetilap, 93, 45 (1952).

СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ ДИАГНОЗ ГЕМОЛИТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ НОВОРОЖДЕННЫХ

Р. Бакхаус и Дь. Нейбауер

Резюме

1. Авторы описывают результаты исследования 96 матерей, приобревших иммунитет за период беременности или родивших детей страдающих гемолитической болезнью новорожденных.

2. У 83 матерей (86,5%) за период беременности изоиммунитет развивался посредством факторов *Rh*, в том числе в 82 случаях посредством фактора *—D* и в одном случае посредством фактора *E*. В 11 случаях (11,4%) изоиммунитет приобретался под воздействием антигенов групп крови *A—B—O*, при чем в 8 случаях антигена *A* и в 3 случаях антигена *B*. В одном случае антиген не был идентифицирован, а в другом — несмотря на поврежденность новорожденного — изоиммунитет не был обнаружен.

3. Изоиммунитет в большинстве случаев выявлялся только за период второй беременности, но в 18 случаях был обнаружен уже за время первой беременности. В 8-и из последних случаев до беременности имело место переливание крови.

4. Материнские анти-*D* противотела у 57 матерей были альбуминового, а в 18 случаях — салинно-агглютининного типа. Салинные агглютинины вообще в меньшей степени вызвали поврежденность плода, чем альбуминовые. Антитела с титром 1 : 128 и выше являются верными индикаторами повреждения плода, но не исключаются повреждения и в случаях низшего титра антител. Следовательно серологические исследования не всегда выявляют внутриматочное повреждение плода.

5. В отношении 10 беременностей анти-*D* противотела образовались вследствие анамнестической реакции, новорожденные являлись *D*-отрицательными, реакция Комбса (Coombs) — также отрицательной, титр материнской сыворотки в 8 случаях был ниже 1 : 8 и в двух случаях колебался между 16—64.

6. При изоиммунитете, развившемся под воздействием агглютининов групп крови *A—B—O*, авторы отмечали повышение титра антител, соответствующих группе крови плода, явление презоны а также повышение титра гемолизина.

7. Биологическая реакция была поставлена у 7 женщин, и метод этот оказался подходящим как для обнаружения изоиммунитета, так и для производства сывороток с высоким титром. Кроме того оказалось, что микротрансфузии в большей степени повышают титр анти-*D* противотел, чем сама беременность.

8. Реакция Комбса, поставленная с кровью пуповины новорожденных, — в тех случаях когда за период беременности в сыворотке матерей обнаруживались антитела — оказалась надежным методом как с прогностической, так и с диагностической точки зрения. Однако в таких случаях желтухи, когда в сыворотке матери наличия анти-*D* противотел не обнаруживалось, реакция Комбса была также отрицательной.

ÜBER DEN ERREGER DER KNOCHENAKTINOMYKOSE DES RINDES

Von
L. HUSSEL

Aus dem Institut für Seuchenlehre und Bakteriologie der Veterinärmedizinischen Hochschule zu Budapest.

Eingegangen am 15. September 1953

Zahlreiche Eigenschaften des Erregers der Knochenaktinomykose des Rindes — Actinomyces bovis (Harz) — erweisen sich als bisher nicht zufriedenstellend definiert. Auch über die Natur der Drusen im aktinomykotischen Gewebsprodukt herrschen noch Unklarheiten. Daher ist es nicht verwunderlich, wenn selbst über einschlägige Nomenklaturfragen ebenfalls Meinungsverschiedenheiten bestehen.

»Actinomyces bovis (Harz)« gilt im allgemeinen als boviner Typ eines von *Wolff* und *Israel* [50, 51] im Jahre 1891 erstmals genau beschriebenen, anaeroben, grampositiven, pleomorphen Keimes. Seine Isolierung erfolgte aus humanem Material. Den Autoren gelang die Erfüllung der drei *Henle*schen Forderungen für die Spezifität des gefundenen Mikroorganismus. Dies erlaubte ihnen, die *Boström*sche [3] Behauptung über eine wesentliche ätiologische Bedeutung aerober Aktinomyzeten (derzeit möchte man sagen: Streptomyzeten) bei Aktinomykosen zurückzuweisen. Die Eigenschaften des Wolff—Israelschen Keimes wurden erst durch *Wright* [52] und andere Autoren mit dem Artnamen Actinomyces bovis (Harz) nachdrücklich in Verbindung gebracht. *Harz* beschrieb seinerzeit nämlich nur Drusen, die zudem noch aus ätiologisch offenbar verschieden gelagerten Fällen (Zungen- und Kieferaktinomykosen) stammten [*Haupt* und *Zeki* 16]. *Lentze* [25] beobachtete sog. Glattformen des Erregers, die später mit dem bovinen Typ identifiziert wurden [*Erikson* 11]. In *Bergey's Manual* [1], das sich bei der Beschreibung von Actinomyces bovis (Harz) auf *Eriksons* [11] eingehende Arbeit stützt, erhält der Keim den Charakter einer eigenen Spezies. Humanmedizinische Untersucher verfahren meist so, dass sie das Hauptgewicht ihrer Arbeit auf die Prüfung humaner Stämme legen und von den in geringerer Zahl kontrollierten bovinen berichten, sie zeigten die typischen »Actinomyces«-Eigenschaften nur kümmerlicher, sporadischer, ausnahmsweise. Veterinärmediziner hingegen, die vor allem den Erreger der Knochenaktinomykose des Rindes zum Gegenstand ihrer Betrachtung machen, finden dessen Actinomyces-Natur überhaupt nicht genügend bestätigt und betonen vielmehr seine engen Beziehungen zu den Corynebakterien [*Klimmer* 20, *Bongert* 2, *Radtke* 41, *Haupt* und *Zeki* 16, *Manninger* 35, *Manninger* und *Bakos* 36]. Neben den grundsätzlichen Meinungsverschiedenheiten darüber, ob der Erreger der Knochenaktinomykose des Rindes ein Aktinomyzet oder ein Bakterium im engeren Sinne, etwa ein Corynebakterium, sei, existieren über seine physiologischen Eigenschaften viele einander widersprechende Angaben.

Mit Hilfe einer vielseitigen Kultivierungstechnik haben wir die Eigenschaften einer Anzahl selbst isolierter Stämme von Aktinomyces bovis (Harz) untersucht und auch einige neue Einblicke in das Wesen der Drusen gewonnen. Wir halten es für notwendig, die Charakteristika von Actinomyces bovis (Harz) nur in Verbindung mit einer eingehenden Darstellung der jeweiligen Untersuchungsmethode zu geben, da dieser Mikroorganismus offenbar doch bereitwilliger als viele andere den modifizierenden Einflüssen zahlreicher Milieufaktoren zugänglich ist.

I. Das kulturelle Verhalten von Actinomyces bovis

Ich untersuchte 15 bovine Kieferaktinomykome. (Für die Überlassung des Krankengutes bin ich den Kollegen vom Budapester Schlachthofe zu Dank verpflichtet.) Es liess sich in jedem Falle Actinomyces bovis nachweisen und in 14 Fällen gelang es mir, fortzüchtbare Stämme zu isolieren. Das einzige Aktinomykom, welches keine offenen Fistelgänge hatte, war durch therapeutische Massnahmen, u. a. mittels Sublimat, günstig beeinflusst worden. In ihm konnte der Erreger mikroskopisch wohl noch nachgewiesen werden, seine Reinzüchtung gelang jedoch nicht mehr.

Alle Aktinomykome wurden am Tage der Schlachtung der Untersuchung zugeführt und jeder Erstkulturversuch spätestens 8 Stunden nach Anfall des Materials angesetzt. Es gibt keine bessere Methode, den fraglichen Keim zu finden, als die Anwendung der nach dem *Fortner*schen Verfahren je zur Hälfte mit Bact. prodigiosum und mit dem Untersuchungsmaterial beimpften, luftdicht verschlossenen, 5—10%igen Blutagarplatte. Wir verwandten Schafblut. Die von Haut, Unterhaut und Muskelteilen befreiten deformierten Knochen wurden zersägt. Nach Abbrennen der Sägeschnitte bohrten wir mit einer sterilen Nadel Löcher in die Eiterherde und in das weiche Granulationsgewebe. Jetzt konnte mittels der Platinöse Material entnommen und als Impfstrich auf die *Fortner*platte gebracht werden. Bei jedem Aktinomykom wurde von 15 verschiedenen Stellen Material entnommen, womit, auf 3—4 *Fortner*platten verteilt, ebensoviele Impfstriche angelegt wurden. Die Platten wurden am 2. oder 3. Tage wieder geöffnet, um Subkulturen herzustellen. Die Beimpfung von Serumbouillon zu Erstisolierungszwecken, die in der Literatur z. T. empfohlen wird, ist nach eigenen Erfahrungen völlig verfehlt. Unspezifische Keime gewinnen immer die Oberhand. Wir sind der Ansicht, dass man von den hier hinsichtlich der Untersuchungszeit und -methode gemachten Angaben nicht wesentlich abweichen darf, wenn, wie es bei uns geschah, in jedem Knochenaktinomykom der spezifische Keim gefunden werden soll.

Von jedem Aktinomykom wurden auch 2 aerobe Blutagarplatten und eine Agarplatte angelegt. Letztere hatte einen pH von 7,1 bis 7,2. Sie sollte, nach *Sásdy* [42], dem eventuell vorkommenden Corynebacterium pyogenes das Wachstum erlauben. Alle aeroben Platten wurden sorgfältig auf das Wachstum grampositiver, pleomorpher Bakterien hin kontrolliert, auch das Vorhandensein von Nocardia- und Streptomyzes-Arten festgestellt, sonst aber nicht weiter berücksichtigt. Sehr unterschiedlich war von Fall zu Fall der Grad der aufzubringenden Arbeit, bevor der jeweilige Actinomyces bovis-Stamm als Reinkultur fest in der Hand war. Zum Teil erschien es unmöglich, die Vielzahl der unter *Fortner*platten-Verhältnissen aufgegangenen fraglichen Kolonien im Ausstrichpräparat zu prüfen. Es wurden dann einfach Abimpfungen vorgenommen. Keime, die in der ersten oder zweiten Subkultur schon in 24 Stunden gut auswuchsen, schieden aus. Die Aufmerksamkeit galt jenen Kolonien, die erst am 2. oder 3. Tage makroskopisch sichtbar wurden. Zum Beispiel waren beim Aktinomykom 12 Pyogenesbakterien fast in Reinkultur sowohl aerob wie auch anaerob gewachsen. Durch Subkulturen vieler anaerob gewachsener, einander ähnlicher Kolonien konnten wir feststellen, dass ein Teil schon nach 24, ein anderer aber erst nach 48 Stunden anging. Unter letzteren Kolonien fanden wir unseren Stamm 12. Wichtig ist es, jeden rein gewonnenen Stamm, bevor er als Reinkultur gehalten werden soll, noch einmal auf eine aerobe Blutagarplatte zu impfen. Sie dient zur nochmaligen Reinheitsüberprüfung.

Die in unseren Protokollen mit IV bis XVIII bezeichneten Aktinomykome, von denen Nr. VI keinen weiterzüchtbaren Stamm lieferte, erscheinen hier als Nr. 1 bis 14 bzw. Stamm 1 bis 14. Alle Prozesse waren offen, zum Teil sehr umfangreich, mit bis zu 3 Fistelöffnungen versehen [besonders 1, 4, 8, 10, 12 und 13]. Zweimal nur lag die Erkrankung des Oberkiefers vor (3 und 11), wobei in dem einen Fall die Orbita mit betroffen war (3). Stamm 5 erhielten wir aus einem sicherlich ganz jungen Prozess mit sehr geringer Auftreibung, aber einer Kommunikation mit einer zerstörten Alveolarwand. Wahrscheinlich junge Vorgänge waren auch die Aktinomykome 2, 9 und 14. Bei einer Operation

anfallendes Material von einem Bullen lieferte den Stamm 7 schon aus der schwartigen Verdickung des Unterhautzellgewebes im Gebiet der Knochenerkrankung. Andere Aktinomykome imponierten zwar durch das Ausmass der Knochenverformungen, enthielten jedoch kaum mehr flüssigen Eiter. Eine etwaige Gesetzmässigkeit zwischen Alter, Grad der pathologisch-anatomischen Veränderung, Gehalt an noch flüssigem Eiter und Menge der enthaltenen Actinomyces-bovis-Keime war nicht festzustellen. Stamm 5 wuchs fast in Reinkultur auf allen *Fortner*platten, Stamm 6 erhielten wir durch eine einzige spezifische Kolonie auf zusammen 15 Impfstrichen. Manchen Erreger hatten wir nach 4 bis 6 Tagen rein, manchen erst nach 14 Tagen. Die aerobe Flora, die in jedem Falle auch Nocardia- oder Streptomyzes-Arten einschloss, war ebensowenig in irgendein Verhältnis zum spezifischen Erreger oder zu dem Grad und der Art des Prozesses zu stellen. Ein Aktinomykom mit 3 Fisteln und Lakunen voll dünnflüssigem Eiter hatte beispielsweise eine sehr geringe aerobe Flora, ein ähnliches aber war voll mit aeroben Keimen besiedelt.

Die *Kolonien von Actinomyces bovis* sind *auf festen Nährböden* immer von salbenweicher Konsistenz und nie dem Medium adhärent. Die Kolonienränder sind geschlossen, selten ganz leicht rosettenartig gebuchtet. Unter keinen Umständen und zu keinen Zeitpunkt einer 3- bis 5-wöchigen Beobachtungsdauer konnten wir an irgendeiner Stelle der Kolonie ausläuferartige Gebilde erkennen. Sog. Rauhformen sahen wir nicht. Bei der Erstzüchtung erscheinen die Kolonien am Ende des 2. Tages, nie aber wesentlich früher und nie wesentlich später. In Subkulturen lassen sich jedoch bereits nach 20 bis 24 Stunden auf dem Impfstrich Kolonien oder zum Impfstrich konfluierendes Material makroskopisch erkennen. Alles schon am ersten oder zweiten Tage nach Bebrütung der *Fortner*platte üppige Wachstum ist unbedingt auf andere Keime zurückzuführen. Die Kolonien variieren in der Grösse zwischen der Feinheit eines Stecknadelstiches und einem Durchmesser von etwa 0,5 bis 1,0, selten mehr mm. Die kleinsten Kolonien gleichen Tautropfen. Die grösseren haben ein feuchtglänzendes, feines Grauweiss, das sich bei Züchtung auf durchsichtigem Serumagar in ein feines Graublau — wie das der Corynebacterium-Pyogenes-Kultur — verwandelt. Nach 5- bis 6-tägiger Bebrütungsdauer hört das Wachstum auf der *Fortner*platte auf. Der ausgesprochen feuchte Glanz verschwindet zugunsten eines leicht bräunlichen Tones im Grau, oder es tritt ein Aufhellen zu einem nicht selten beachtlichen Grad von Weiss ein. Stamm 5 zeigte bereits als Primärkolonie ein fast reines Weiss. Dies verlor sich später. Stamm 14 wurde erst nach wochenlangen Passagen weiss. Nicht verunreinigte Impfstriche bilden in ihren ersten Teilen, vom Ansetzen der Platinöse gerechnet, einen zusammenhängenden Wall von Mikrobenmaterial, der dieselben Farbqualitäten wie die Einzelkolonie aufweist. Dieser Wall kann ein, zwei und mehr mm breit werden. Daher darf, wenn auch nur hin und wieder, von einem etwas üppigeren Wachstum die Rede sein. Oft begleiten feine Einzelkolonien den Impfstrich. Kegel-

artige Erhebungen im Impfstrich und in der Einzelkolonie bleiben stets im Bereich des Mikroskopischen. Solche mammiläre Formen zeigten aber im Elektronenmikroskop auch schon bloss 18 Stunden alte Kolonien. Die salbenweiche Konsistenz der Kolonien ändert sich auch nach 2monatiger Bebrütung oder Haltung im Kühlschrank nicht. Kein Stamm ausser Nr. 5 wuchs mit Hämolysehof bei der Erstisolierung auf Schafblutagar.

Sehr wichtig ist die Beobachtung, dass in keinem Falle bei Erstisolierungsversuchen Actinomyces bovis auf irgendeiner aeroben Platte auch nur ganz gering zum Vorschein kam. *Die von uns gewonnenen Stämme waren strikte Anaerobier. Dies gilt für die Erstzüchtung.* Lediglich Stamm 7 wurde auch auf einer »aeroben« Blutplatte gefunden. Hier handelte es sich jedoch nur um eine scheinbare Ausnahme. Die betreffende Petrischale war nämlich ausnehmend flach, und beim Herausnehmen aus dem Thermostat erwies sich der Deckel der Petrischale als mit der Bodenschale verklebt. Unter solchen Verhältnissen hatten offenbar die zahlreich gewachsenen Begleitkeime ähnliche Bedingungen geschaffen wie beim *Fortner*schen Verfahren. Unbeschadet der primären strikten Anaerobiose trat aber bei allen Stämmen *nach mehreren Fortner-Plattenpassagen eine mehr oder weniger ausgesprochene Sauerstoff-Toleranz* auf. Es war dann möglich, auf aeroben Blutplatten am 3. und 4. Tage, bei Stamm 14 am 12. Tage, ein spärliches Wachstum zu erzielen. Der Übergang der Anaerobiose oder der Mikroaerophilie, jedenfalls der Wachstumsgewohnheiten unter den Bedingungen der *Fortner*platten-Kultur, in die Fähigkeit, auch bei freiem O_2-Zutritt ein wenig zu wachsen, konnte beschleunigt und verstärkt werden durch eine Hühnerei-Passage der Stämme. Mit 10 von unseren 14 Stämmen wurden eigens dafür bestimmte Untersuchungen angestellt, diese zunächst am Stamm 5 gemachte Beobachtung in grösserem Rahmen zu bestätigen. Bei Verwendung frischer Markteier, die nach der Beimpfung mit Kulturmaterial sorgfältig mit Paraffin wieder verschlossen wurden, konnte durch 9 bis 21tägige Haltung im Ei bei 37° bei 8 Stämmen ein aerobes Wachstum auf Blutplatten herbeigeführt werden. Versuchsweise wurde eine der aerob erzielten Subkulturen wechselweise auf Blut- und Serumagar bis zur 10. Subkultur weitergeführt. Diese wurde nach 27 Tagen erreicht. Von der 5. Subkultur an waren im Gram-Ausstrichpräparat viele kokkoide Gebilde zu sehen. Das Wachstum war am Ende nur noch sehr kümmerlich. Die Stämme waren vor der Verimpfung auf Ei nicht oder nicht vor dem 4. und 5. Tag aerob angegangen. Jetzt wuchsen die aeroben Subkulturen schon am 2. Bebrütungstage aus. Sie wurden anaerob geprüft, um nachzuweisen, dass nicht mit Fremdkeimen gearbeitet wurde.

Hinsichtlich der Beobachtung, dass Actinomyces bovis als boviner Typ des Wolff—Israelschen Mikroorganismus nie dem Medium adhärent wächst, wodurch er sich kulturell von humanen Stämmen deutlich unterscheiden soll, herrscht in der Literatur im wesentlichen Übereinstimmung. [*Klimmer* 20, *Bongert* 2, *Magnusson* 33, *Orskov* 40, *Hülphers* 17, *Haupt* und *Zeki* 16, *Lentze* 25, *Radtke* 41, *Erikson* 11, u. a.] Auch von der steigenden Sauerstofftoleranz wird berichtet [*Wolff* und *Israel* 51, 52). *Erikson* [11] beobachtete dieses Phänomen besonders in Gegenwart von nativem Eiweiss. *Wright* [52] demonstriert als erster die Mikroaerophilie des Keimes.

In Glukoseagar vor der Erstarrung suspendiert, bilden die Keime bevorzugt in einer Zone Kolonien, die dicht unterhalb der Oberfläche der Nährbodensäule liegt. Allerdings soll der bovine Typ diesen Effekt nur seltener zeigen. Er könne nämlich auch diffus verteilt wachsen / *Waksman* 48]. *Naelsunds* [37] Actinomyces »Alpha«, auf Agar nur kümmerlich wachsend, ist identisch mit dem Wolff—Israelschen Keim und streng anaerob. *Dresels* [9, 10] Stämme bleiben strikt anaerob, ebenso diejenigen von *Joannides* [19], *Lieske* [26], *Schlegel* [43] und *Neuber* [38, 39] konstatieren einen Übergang der Anaerobiose zu völliger Aerophilie. Wir haben Grund zur Annahme, dass diese Autoren den Wolff—Israelschen Keim gar nicht in der Hand gehabt haben. *Haupt* und *Zeki* [16] erhalten erstaunlicherweise ihre bovinen Stämme mit vorzugsweise aerob arbeitenden Verfahren. *Lentzes* [25] Glattformen kommen nur anaerob zur Entwicklung, und zwar erst nach 24 Tagen.

Wie *Fortner*platten angelegte *einfache Agarplatten* gestatteten nur einem unserer Stämme (5) ein ganz schwaches Wachstum nach 6 bis 8 Tagen.

Mit Rücksicht auf die Beoabachtung von *Erikson* [11], wonach einer ihrer bovinen Stämme am 9. Tage komplette Hämolyse zu verursachen vermochte, prüften wir das *Hämolysevermögen* unserer Stämme. Die Untersuchung des Hämolysevermögens geschah bei 10 Stämmen derart, dass diese zunächst gemeinsam auf eine einzige *Fortner*platte gegeben und bebrütet wurden. Damit sollte die Ausgangskondition eines jeden Stammes möglichst gleichartig gestaltet werden. Die Subkulturen wurden desgleichen immer auf derselben Platte vereinigt. Zum Vergleich gelangten Menschen-, Schaf- und Pferdeblut. Die Blutzusätze zum Agar waren jeweils 5, 10, 15, 20, 25 und 30%ig. Die Ablesung der Ergebnisse erfolgte nach 20, 48 und 140 Stunden.

Wir können folgende Beobachtungen verallgemeinern: *Sämtliche Stämme waren hämolytisch wirksam*, die Erscheinungen der Hämolyse waren jedoch keinesfalls stark ausgeprägt und namentlich mit einer β-Hämolyse gewisser Streptokokken durchaus nicht vergleichbar. Nur einer unserer Stämme (Nr. 5) verursachte temporär eine kräftige Hämolyse. Am intensivsten gestaltete sich die Hämolyse in 5 und 10%igem Menschenblutagar schon nach 20 Stunden. Ein solcher Grad der Hämolyse wurde auf ähnlichem Pferdeblutagar erst nach 48 Stunden erreicht. Bei Konzentrationen von über 10% Blut ist die Überlegenheit des Menschenblutagars über dem Pferdeblutagar nicht mehr deutlich gewesen. Gelegentlich erwies sich 30%iger Pferdeblutagar sogar als empfindlicher. Am wenigsten intensiv war die Hämolyse auf Schafblutagar. Hier blieb die Hämolyse bei Blutkonzentrationen von über 35% bereits überhaupt aus. Auf Blutagarplatten, deren Konzentration an Blut nach 20 Stunden eine Hämolyse nicht zuliess, trat Hämolyse selbst nach 140 Stunden nicht mehr auf. *Hämolyse wurde nur unter anaeroben Bedingungen beobachtet.* Nach Übergang in einen gewissen Grad von Aerophilie verloren die Stämme das Hämolysevermögen, gelegentliche Vergrünung im Bereich der Kolonien kam jedoch zur Beobachtung.

In blosser *Nährbouillon* wächst Actinomyces bovis nur spärlich. Der *Zusatz weniger Tropfen sterilen Schafblutserums* zu den Bouillonröhrchen begünstigt das Wachstum jedoch ausserordentlich. 2 bis 3 ccm Schafserum auf 15 ccm Nährbouillon ist das experimentell nachweisbare optimale Verhältnis beider

Medien, sofern man grosse Keimmengen, z. B. zur Antigenbereitung, zu ernten wünscht. Noch grössere Serumzusätze fördern nicht mehr wesentlich. Alle Stämme wuchsen auch ohne Paraffin- oder Ölabdeckung der Serumbouillon. Die Menge des Bodensatzes schwankt bei den einzelnen Stämmen oft beträchtlich. Wir sahen nach einmonatiger Bebrütung unter Paraffinabschluss weichflockigen Bodensatz von einigen mm Höhe (Stämme 3, 5, 7), aber auch nur Bildung einzelner Bröckchen von Kleinlinsengrösse (Stamm 14). Lediglich Stamm 3 und 14 trübten die Bouillon vom 2. bis 5. Tage. Die später wieder verschwindende Trübung weicht einer Art »Hinaufkriechen« feinster Bröckchen besonders an den Glaswänden. Sie ist unschwer von banalen Verunreinigungen zu unterscheiden. Die ganz offenbare Serophilie von Actinomyces bovis lässt sich auch durch Verwendung von wie *Fortner*platten hergerichteten 20%igen *Serumagarplatten* demonstrieren, auf denen der Keim ebenso gut wächst wie auf Blutagar.

Zur reichlichen Vermehrung von Actinomyces bovis eignen sich sehr gut zum fünften Teil mit Serumbouillon gefüllte, kleine Erlenmeyersche Kölbchen, wenn der Wattestopfen luftdicht paraffiniert wird.

Bei Bouillonkulturversuchen stellten wir eine sehr geringe *Penicillinresistenz* eines unserer Stämme fest. 1666 E/ccm Serumbouillon hemmten das Wachstum deutlich, 8333 E/ccm Serumbouillon unterdrückten es fast völlig.

Bei einigen Stämmen stellten wir auch ein *proteolytisches Vermögen* fest auf schräg koaguliertem Schafserum in Röhrchen, die nach dem *Preisz*schen Anaerobenverfahren unter Verwendung von etwa 1,5 g Pyrogallol und etwa 1,5 ccm 10%iger KOH sofort nach der Beimpfung verschlossen wurden. Zunächst senkt sich der geschlängelte Impfstrich zu einem Graben ein, wie wir das vom Corynebacterium pyogenes kennen. Im Verlaufe einer einmonatigen Bebrütung, frühestens schon nach etwa 8—12 Tagen, können dann typische sog. Fischgrätenmuster entstehen. Schliesslich kann der ganze Serumkeil in eine hellgelbe klare Flüssigkeit verwandelt werden. So weit kam es allerdings nur bei 3 Stämmen. Unter unseren zuletzt isolierten, also jüngsten Stämmen fanden sich 4, die gar nicht proteolytisch auf Schafserum einwirken konnten.

Das *Preisz*sche Anaerobenverfahren erwies sich übrigens, auf Schafblut-Schrägagar angewandt, auch gut geeignet für das Aufbewahren der Stämme als Reinkultur. Alle Kultureigenschaften entsprechen hierbei denen der *Fortner*platten. Solche Kulturen bebrüten wir 4 bis 6 Tage und können sie dann 4 bis 5 Wochen in übertragungsfähigem Zustande im Kühlschrank halten. Stämme auf einmal geöffneten *Fortner*platten erhalten sich im Kühlschrank höchstens 1 bis 2 Tage lang übertragungsfähig.

Vielfach berichtet die Literatur, dass eine Anreicherung von *Kohlensäure* im Luftmedium über der Actinomyces-bovis-Kultur ebenso wie beim humanen Typ des *Wolff—Israel*schen Keimes der Kolonie-Entwicklung günstig wäre [*Vawter* 47]. Ein 10 bis 15%iger CO_2-Gehalt soll optimal sein. *Erikson* [11] stellte jedoch fest, dass H_2 dieselbe stimulierende Wirkung haben kann. Bovine Typen seien ausserdem weniger durch CO_2 beeinflussbar als humane.

Das Wachstum von Actinomyces bovis in nach dem *Preisz*schen Anaerobenverfahren verschlossenem Schafblut-Schrägagarrörchen beweist an sich schon die geringe Bedeutung der CO_2-Anreicherung. Wichtig dürfte nur die Veränderung der Sauerstoffspannung sein. Dennoch prüften wir diese Frage im besonderen. Von einer gemeinsamen Ausgangsplatte wurden 7 Stämme auf 10%igem Schafblutagar in Subkultur gebracht. Die Platten fanden nun Aufnahme in einem Anaerobentopf, dessen Luft partiell evakuiert und zum Teil durch CO_2 aus dem *Kipp*schen Apparat ersetzt wurde. Der CO_2-Gehalt wurde bei den einzelnen Versuchen von 5% bis auf 30% in Stufen von 5% erhöht. Die Bebrütungdauer betrug 24 Stunden und, nach einer Kontrolle mit Neufüllung des Topfes, nochmals 48 Stunden. Kontrollplatten wurden in auf 2 bis 3 mm Hg-Druck evakuierten Gefässen geführt. Alle Platten bewahrten wir bis zum Ende des Gesamtversuches im Kühlschrank auf, so dass sie gemeinsam zum Endvergleich zur Verfügung standen. Nur eines ergab sich mit Sicherheit: in stark evakuiertem Anaerobentopf und bei einer CO_2-Konzentration von über 30% zeigte sich eine deutliche Wachstumshemmung. Die Stämme wuchsen zwar bei 15% CO_2 recht gut, aber gegenüber geringeren Konzentrationen nicht offensichtlich besser. Analog zu diesem Versuch machten wir übrigens die Beobachtung, dass unsere Stämme alle Kultureigenschaften regelmässig ohne Rücksicht darauf entwickelten, ob als *Fortner*sche Platte eine besonders flache oder eine besonders hohe *Petri*schale, ein breites Prodigiosum-Feld oder ein schmaleres verwendet wurde.

Nicht einheitlich sprechen sich die einzelnen Autoren über die *fermentative Tätigkeit gegenüber Zuckerarten und höheren Alkoholen aus. Erikson* [11] notiert Angriff auf Glukose, Laktose, Saccharose und Maltose innerhalb der ersten Bebrütungstage. Humane Stämme greifen nach 21 bis 30 Tagen ausserdem noch Mannit und Salicin an. *Haupt* und *Zeki* [16] beobachten Spaltung von Glukose, Laktose, Maltose, Galaktose, Laevulose, Dulcit, Dextrin und Inulin sowie Glyzerin. *Lentzes* [25] S-Formen greifen u. a. auch Raffinose an. 12 unserer Stämme prüften wir in mit Serum versetztem Peptonwasser ($P_H = 7{,}4$, Zucker- bzw. Alkoholzusatz 1,5 bis 2%, Paraffinabdeckung). 3wöchige und 3tägige Bebrütung führte nicht zu unterschiedlichen Ergebnissen. Zur Ablesung wurden 2 bis 3 Tropfen Bromthymolblaulösung nach beendeter Bebrütung als Indikator zugesetzt. Entsprechende Kontrollen liefen mit. Unsere Stämme griffen ohne Gasbildung Glukose, Laktose, Saccharose, schwächer auch Maltose und Laevulose an. Arabinose, Dulcit, Sorbit, Raffinose, Mannit und Galaktose blieben unverändert.

Wir versuchten die Kultur unseres Keimes auch auf der *Fortnerschen Mikroplatte* [16], jedoch sistierten die Keime immer sehr schnell im Wachstum. Immerhin liess sich einige Tage hindurch ihre Morphologie gut studieren. Ausgesprochene Fadenbildung sahen wir in keinem Falle.

Es ist ein Nachteil, dass die zur Kultur von Actinomyces bovis so vortrefflich geeignete *Fortner*platte nach Öffnung zu Kontrollzwecken u. dgl. nicht

wieder in den alten Zustand hinsichtlich des eingeschlossenen Gas-Mediums versetzt werden kann. Gelegentlich füllten wir aber in einen passenden Petrischalen-Deckel Pyrogallol und KOH-Lösung, verschlossen mit einem vorbereiteten Knetmassenring die zu erhaltende Kultur luftdicht und liessen nun die Lauge zum Pyrogallol fliessen. Hierdurch wurde der Sauerstoff der eingeschlossenen Luft absorbiert. Auf diese Weise konnten Kulturen wenigstens so lange erhalten werden, bis feststand, dass die Subkulturen gelungen waren.

Weitere Kulturversuche mit unseren Stämmen, die eine weitgehende Übereinstimmung in ihren Eigenschaften untereinander zeigten, stellten wir im Dienste morphologischer Untersuchungen an. Davon wird weiter unten berichtet.

II. Untersuchungen über das serologische Verhalten von Actinomyces bovis

Die serologischen Effekte von Actinomyces bovis zu studieren, ist eine von vornherein beschränkte Aufgabe. Uns standen leider keine humanen Stämme des *Wolff—Israel*schen Mikroorganismus zur Verfügung. Damit war ein Vergleich unserer Keime mit denjenigen, die die »Actinomyces«-Eigenschaften besonders deutlich zeigen sollen, unmöglich, obwohl dies um so wichtiger gewesen wäre, als nach *Erikson* [15], *Topley* und *Wilson* [63] u. a. der humane Typ vom bovinen serologisch völlig verschieden sein soll. Zudem lebt der von *Bollinger* beschriebene, von *Harz* ebenfalls untersuchte und später als boviner Typ des von *Wolff* und *Israel* isolierten Mikroorganismus bezeichnete Actinomyces bovis epiphytär im Verdauungstrakt des Rindes [*Wright* 52, *Naelsund* 37, *Magnus* 32]. Verursacht er dennoch pathologische Prozesse, so bleiben diese beim Rinde vorzugsweise streng lokalisiert. Der Gesamtorganismus wird also nicht, wie bei einer akuten Infektionskrankheit mit Stadien der Bakteriaemie oder Viraemie, in die Infektionsabwehr einbezogen. Die Serumveränderungen im Sinne der Antikörperbildung werden daher voraussichtlich geringfügig bleiben. Die intravenöse Keimapplikation beim Kaninchen hingegen wird dessen gesamten Infektionsabwehrapparat anlässlich der Aufgabe, die zugeführten Antigensubstanzen parenteral zu verdauen, aktivieren. Die Prägung der Zellstoffwechsel-Endprodukte mit dem Ergebnis der Erscheinung von spezifischen Antikörpern ist daher viel nachdrücklicher als bei lokaler Knochenaktinomykose.

Gins und *Paasch* [13] gehen so weit, zur Diagnose der echten Aktinomykose (beim Menschen) den Nachweis spezifischer serologischer Beziehungen zwischen isoliertem Keim und Patientserum zu fordern. Für das Rind scheint diese Forderung aus oben angegebenen Gründen nicht hinreichend gerechtfertigt zu sein. Es sind nicht genügend grosse Differenzen zwischen Normal- und Krankenseren-Titern zu erwarten. [*Erikson* 11, *Topley—Wilson* 46, u. a.] Die serologische Aktivität der bovinen Typen ist übrigens besonders gering [*Erikson* 11]. Beim Kaninchen waren z. T. Agglutinationstiter von nur 1 : 640 und weniger zu erzielen.

Wir verfuhren bei unseren Versuchen folgenderweise.

Es ist nach unseren Erfahrungen leicht zur Ausführung der *Agglutinationsprobe* eine homogene Suspension von Actinomyces-bovis-Keimen herzustellen. Das durch Zentrifugierung

gewonnene Sediment 3 bis 5 Tage alter Serumbouillonkulturen in Erlenmeyerkölbchen wird dreimal gewaschen und 12 Stunden mit Glasperlen geschüttelt. Zu Immunisierungszwecken wird eine 0,2% Formalin enthaltende Suspension dieses vorbehandelten Materiales hergestellt und wenigstens 2 Tage im Kühlschrank gehalten. Bei Herstellung einer Keimsuspension für Agglutinationsversuche verzichtet man auf einen Formalinzusatz und stellt auf Dichte Brown-Skala 4 ein.

Kaninchen immunisierten wir durch Injektion des abgetöteten Antigens, Dichte wie Brown 5, in die Ohrvene : Am 1. Tag 1,5 ccm, am 7. Tag 2,0 ccm, am 10. Tag 2,5 ccm und am 16. Tag 3,0 ccm. Zur letzten Injektion verwendeten wir lebendes Material. Die Entblutung der Tiere durch Herzpunktion erfolgte am 7. Tag nach letzter Injektion bei einem Probe-Agglutinations-Titer von 1 : 640 bzw. 1 : 10240 und 1 : 20480.

Wir stellten 3 Kaninchen-Immunseren (Stämme 4 bis 6) her und hatten ausserdem die (Kranken-)Seren der Rinder zur Verfügung, die uns die Stämme 7 und 11 lieferten. Autoagglutinationen begegneten wir mit vollem Erfolg durch Verwendung 0,4%iger Kochsalzlösung statt physiologischer.

Zu den *Präzipitationsversuchen* mit Kaninchen und Rinderseren wurden Säureextrakte aus unseren Stämmen hergestellt. Das von uns befolgte Verfahren lehnt sich eng an das zur Differenzierung der Streptokokken und Rotlaufstäbchen benutzte. [Eine eingehende Darstellung der Technik s. u. a. bei *Szent Iványi* 45]. 48 bis 72 Stunden lang bebrütete Serumbouillonkulturen wurden 10 bis 15 Min. bei 3000 Umdrehung zentrifugiert, das Sediment 3 bis 4 mal gewaschen, zu jedem Sediment 2 ml n/20 HCl gegeben, die Röhrchen 15 Min. in kochendes Wasserbad eingestellt (Extraktionsprozess!), dann wurden nach dem Abkühlenlassen 2 Tropfen Phenolrot-Indikator zugesetzt und von n/1 NaOH-Lösung mittels Pasteurpipette soviel zugesetzt, bis der Extrakt gerade rosa erschien (nach jedem Tropfen umschütteln!). Endlich wurde soviel n/10 HCl hinzugegeben, bis die rosa Farbe verschwand. Nun erwies sich der Extrakt als neutral. Nach kräftigem Zentrifugieren hatten wir im Supernatant das in Verdünnungen auf die Immunseren zu schichtende Medium vor uns.

Alle Stämme reagierten in Agglutinationsversuchen auch mit Kaninchen- und Rinder-Normalseren. Stamm 4 ging in den Normalseren-Kontrollen z. B. bis 1 : 320 mit. Die höchsten Agglutinationstiter der Kaninchenseren mit ihren homologen Stämmen nannten wir schon. Die nicht homologen Stämme wurden von den Kaninchenseren meist bis zur Titergrenze agglutiniert, einige gingen jedoch ein oder zwei Verdünnungen weniger weit mit.

Durch die Seren der kranken Rinder wurden selbst die homologen Stämme nur wenig spezifisch beeinflusst. Die Titer waren nur wenig höher als in den Kontrollen mit normalen Rinderseren.

Die Übersichtung der Immunseren mit den 1 : 4, 1 : 2 und 1 : 1 verdünnten Säureextrakten aller Stämme ergab innerhalb 3 bis 6 Min. dort, wo homologe Medien zusammentrafen, einen Trübungsring. Seine Ausbildung war aber stets sehr schwach. Unsere Stämme reagierten aber auch mit den verschiedensten nicht homologen Seren. So zeigte sich z. B. ein Trübungsring, wenn der Säureextrakt von Stamm 5 mit den beiden Krankenseren vom Rind und der von Stamm 11 auch mit dem zweiten Rinderserum sowie den Kaninchenseren zusammentrafen. Stamm 14 reagierte mit Rinderserum 11 und Kaninchenserum 5. Mit Normalseren traten keinerlei Reaktionen ein. Der Säureextrakt eines Corynebacterium pyogenes-Stammes wurde in die Untersuchungsreihen einbezogen. Er reagierte mit keinem der Immunseren, schwach aber mit einem Rinder-Normalserum.

Mit Hilfe der verwandten Seren gelang es uns somit mit der Agglutinationsprobe nicht, bei unseren 12 Stämmen wesentliche Unterschiede im Antigen-Aufbau festzustellen, die ihre Einteilung in Untergruppen rechtfertigen würden.

Serologische Reaktionen im Interesse differentialdiagnostischer Untersuchungen beim Rinde mit Knochenaktinomykose dürften wenig Wert haben. Auch entbehren sie völlig der Notwendigkeit in der Praxis.

Die Säureextrakt-Versuche mit Actinomyces-bovis-Stämmen bedürfen vor endgültigen Schlussfolgerungen noch der Anwendung einer grösseren Zahl besser präzipitierender Seren.

III. Morphologische Untersuchungen

Das nach *Gram* gefärbte Ausstrichpräparat von jungem *Fortner*platten-Kulturmaterial des Actinomyces bovis vermittelt das Bild eines pleomorphen,

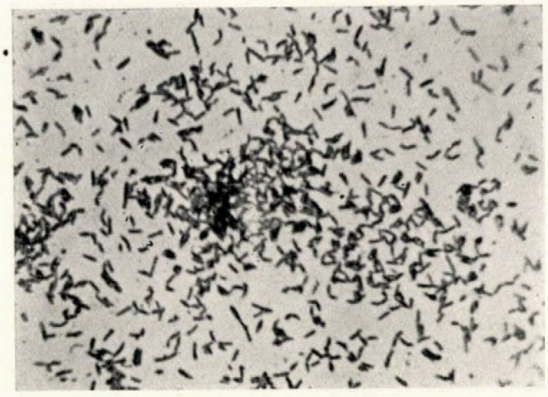


Abb. 1. Actinomyces bovis. Ausstrich einer 3 Tage alten Kultur auf *Fortner*platte. Gramfärbung (1200 : 1)

grampositiven Bakteriums, das dem Corynebacterium pyogenes zum Verwechseln ähnlich ist (Abb. 1). Der Einzelkeim ist nach *Manninger* [35] 0,5 bis 1,0 μ lang und 0,2 bis 0,4 μ breit. Nach *Haupt* und *Zeki* [16] differiert seine Länge zwischen Faden und Kokkenform, und seine Breite gleicht der eines Rotlauf- oder Diphtheriebakteriums. Kokkoide Elemente sind jedoch nur in älteren Oberflächenkulturen oder in Bouillonkulturen häufig zu finden. *Die Hauptform ist diejenige des Kurzstäbchens.*

Es gibt wohl keinen Autor, der das Vorkommen gelegentlicher Verzweigungen und Fäden bei Actinomyces bovis ganz und gar in Abrede stellt. Auch *Haupt* und *Zeki* [16], die so entschieden die Actinomyces-Natur des Erregers der bovinen Knochenaktinomykose bestreiten, finden durchaus Verzweignugen der Stäbchen und Fäden. Sie vermissen jedoch die Bildung »pilzartiger« Kolonien, Entstehung von Lufthyphen und Vorkommen von Gonidien. *Eriksons* [11] Kriterien für die Zugehörigkeit zu den Actinomyceten sind hingegen derart formuliert, dass unser Keim durchaus dazu zählen dürfte : positives Gram-Verhalten, Fadenbildung, echte Verzweigungen in einigen Wachstumsphasen, Mikroaerophilie, Herkunft aus den typischen Granula im aktinomykotischen Eiter. Nicht das Grampräparat zeige die Actinomyces-Formelelemente, sondern diese sollen nur in in-situ-Kolonien gesehen werden können [*Orskov* 40, *Lentze* 25, *Erikson* 11, u. a.]. *Orskov* deckt zu diesem Zwecke z. B. Kulturen in *Petri*schalen mit Deckgläschen ab und

mikroskopiert sie. *Lentze* legt Stichkulturen in hoher Levinthal-Kochblutagarschicht 2 mm neben der Röhrchenwand an und sieht Coryneformen und Fäden, sobald die Kolonien den Flüssigkeitsraum zwischen Glaswand und Nährmedium erreichen.

Ein Teil der in Kulturmaterial-Ausstrichpräparaten gefundenen verzweigten Gebilde ist nach unseren Erfahrungen nicht mit Sicherheit von entsprechenden passiven Zusammenlagerungen aus Einzelelementen zu unterscheiden. Unsere Handzeichnung (Abb. 2) bringt jedoch *einige verzweigte Formen*, von deren Echtheit wir überzeugt sein dürften. Ihre Dicke entspricht der der Einzelstäbchen, ihre Länge etwa dem 5 bis 8fachen eines solchen. Wir konnten

Abb. 2. Actinomyces bovis. Ausstriche von Kulturen auf Fortnerplatte. I: links 3 Tage alte rechts 13 Tage alte Kultur; II: 6 Tage alte Kultur. Ölimmersion. Handzeichnung; a: etwa 5fache Länge eines Kurzstäbchens

elektronenmikroskopisch in 18 Stunden alten, auf mit Kollodiummembran überzogenen *Fortner*platten gewachsenen Kolonien, echte Verzweigungen nachweisen (Abb. 3). Elektronenoptische Bilder solcher junger in-situ-Kolonien zeigen aber auch, dass das pleomorphische Kurzstäbchen nicht das Ergebnis des Zerbrechens (hypothetischer) Actinomyces- (Streptomyces-)Fäden ist, sondern, dass es bereits fertig ausgebildet in jüngsten Kolonien, und zwar in überragender Mehrzahl, vorhanden ist (Abb. 4).

Zur *Herstellung der Kolloidummembran* auf der einen Hälfte der zur *Fortner*platte verarbeiteten Blutplatte wird eine 0,2%ige Kollodiumlösung auf die Plattenhälfte ausgegossen und so lange umgekehrt bei Zimmertemperatur gehalten, bis Geruchlosigkeit die völlige Verdampfung des Lösungsmittels anzeigt. Die Rückseite der betreffenden Plattenhälfte ist zu kennzeichnen, da die angetrocknete Kollodiummembran mehr oder weniger unsichtbar ist. Nach einem 20-minutigen Brutschrankaufenthalt (Platte geöffnet und umgekehrt!) erfolgt das Aufbringen der mit steriler physiologischer Kochsalzlösung hergestellten, sehr dünnen Suspension von Actinomyces bovis mittels Pasteurpipette. Die Beimpfung der anderen Plattenhälfte mit Bact. prodigiosum sowie der übliche Verschluss der Platte sollen unmittelbar folgen. Spätestens nach 18 Stunden Bebrütungszeit — es ist dann schon ein feiner Keimrasen sichtbar geworden — wird die Platte geöffnet und 10 Minuten über aufsteigende Formalindämpfe gehalten. Zur Herstellung der

Präparate für das Elektronenmikroskop werden Bakterienrasen, Membran und Blutagar gemeinsam gitterförmig durchschnitten und das auf einen Spatel geschobene Material vorsichtig mit einer ruhenden Wasseroberfläche in Berührung gebracht. Dabei setzen sich — einige Übung vorausgesetzt — die den Keimrasen tragenden Membranviereckchen infolge ihrer Hydrophobie von den absinkenden Blutagarteilchen schwimmend ab. Mit den Kupferrastern hebt man nun von unten her die Membranstückchen vom Wasser ab und bringt sie zum Festhaften auf den Rastern durch Absaugen der Feuchtigkeit mittels kurzen Auflegens auf Filtrierpapier. Die so hergestellten Präparate werden mit Gold bedampft. (Für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen bin ich *Dr. Béla Lovas*, Elektronenmikroskopisches Laboratorium der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, zu Dank verpflichtet.)

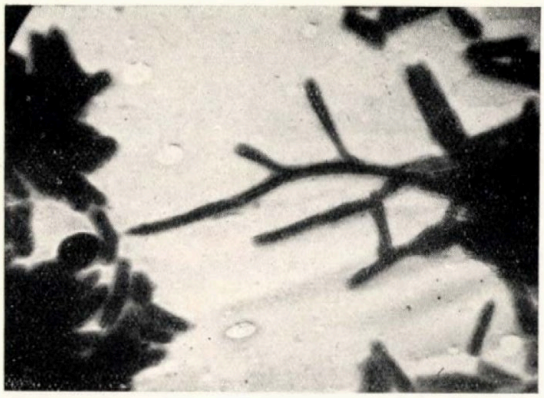


Abb. 3. Actinomyces bovis. 18 Stunden alte in-situ-Kolonie auf *Fortner*platte ; elektronenmikroskopische Aufnahme (4200 : 1)

Abb. 4. Actinomyces bovis. 18 Stunden alte in-situ-Kolonie auf *Fortner*platte ; elektronenmikroskopische Aufnahme (3400 : 1)

Eine irgendwie charakteristische Lagerungsform der Kurzstäbchen im Grampräparat gibt es nicht. Gelegentlich fällt höchstens einmal die Parallellage je zweier Keime in Form eines Gleichheitszeichens auf. Viele Einzelstäbchen ähneln schulmässig geschriebenen Kommazeichen. Die keulenförmige Anschwellung des Stäbchens — sie ist relativ häufig — betrifft immer nur den einen Pol.

Sind die *Fortner*schen Plattenkulturen älter, etwa 7 bis 10 Tage alt, so zeigen sich in den Gram-Ausstrichpräparaten sehr oft, aber nicht immer, bedeutende Veränderungen der Keime. Die Pleomorphie ist erheblich gesteigert. Zuweilen treten in Massen Degenerationsformen auf, die in extremen Fällen an Zelldetritus erinnern. Die Keime sind nur noch ungleichmässig gramfest, granuliert und unscharf berandet. Der Nachweis von Winkelformen, Fäden und Verzweigungen setzt nur noch geringere Mühe voraus (Abb. 5).

In *Fortner*schen Mikroplatten können Formen beobachtet werden, welche denen, die *Rippel-Baldes* in seiner »Mikrobiologie« (1948. Abb. 47 auf S. 76) von Mycobacterium phlei bringt, sehr ähnlich sehen und sich durch ringförmige, hellere Stellen, besonders an den Enden, auszeichnen.

Abb. 5. Actinomyces bovis. 13 Tage alte Kultur auf *Fortner*platte; elektronenmikroskopische Aufnahme (6000 : 1)

In Serumbouillon treten schon nach 3 bis 6 Tagen viele gramlabile und gramnegative fädige Gebilde mit perlenschnurartig aufgereihten gramfesten Granula auf. Verzweigungen sind ebenso häufig wie Haufen kokkoider Elemente. Noch immer aber bleibt das Kurzstäbchen die das Gesichtsfeld beherrschende Form (Abb. 2 II)

Die Ränder von *Fortner*schen Platten-Kolonien liessen sich in Klatschpräparaten bei vorsichtigem Andrücken eines Deckgläschens, nach Fixierung in gefärbtem Zustand gut abbilden. Weder junge noch 3 bis 4 Wochen alte Kolonien zeigten dabei mit Ausläufern und Fäden zu vergleichende Gebilde. Vielmehr finden sich eng gepackte, ziemlich monomorphe Stäbchen ohne besondere, irgendweise regelmässige Anordnung.

Auch aus Schüttelagar herausgeschnittene Kolonien brachten keine anderen morphologischen Bilder wie die Oberflächenkulturen. Die körnelig aussehenden, aber ganz weichflockigen, fast zerfliesslichen Kolonien in Serumbouillon konnten ohne erhebliche mechanische Verletzung überhaupt nicht unter das Objektiv gebracht worden.

Wolff und *Israel* [50, 51] stützen sich beim Nachweis der Fadenbildung ihrer humanen Stämme besonders auf die Eikultur. In 9 bis 28 Tagen hatten sich aus den eingeimpften Kurzstäbchen »prachtvolle« Fadennetze entwickelt. Dichotom verzweigende Fäden verwirrten sich zu Knäueln und Rasen. Zahlreiche gute Photographien belegen diese Befunde. *Vawter* [47] photographierte Fäden und Kolben von Actinomyces bovis aus Serumbouillonkulturen.

Wir selbst konnten mit Actinomyces bovis in 32 Eikulturen niemals jene fädigen Formen von *Wolff* und *Israel* finden. Die Ausstriche lieferten z. T. Nester unveränderter oder zerfallender Keime (sie waren gramnegativ oder enthielten grampositive Gebilde), z. T. auch Fäden. Wir wollen jedoch diese letzteren Gebilde nicht mit dem eingeimpften Material in Verbindung bringen, obwohl sie in unseren Kontroll-Eiern fehlten. Sie bestanden aus vielfach gewundenen und sich bogenförmig ausspannenden Fäden, die sogar kleine kolbenförmige Seitenäste haben konnten. In den Maschen der Netze breiteten sich oft Kleckse von Gramfarbstoffen aus. Eben dieser Umstand verhinderte ein klares Urteil über die Natur dieser Strukturen. Ebensowenig werteten wir feinste grampositive Fadengewirre, die vorwiegend am Rande des Ausstrich-Materiales lagerten, da ihr Vorkommen auch in unbeimpften Kontroll-Eiern ihre Unspezifität bewies. Auf Grund unserer Erfahrungen raten wir zu allergrösster Zurückhaltung bei der Beurteilung mikroskopischer morphologischer Strukturen, die zum Teil sogar gramfest sind, wenn sie in Ausstrichpräparaten von lange Zeit bebrüteten Eiern oder von lange Zeit bebrüteten Kulturen in serumhaltigen Medien stammen. Noch grösser sind die Täuschungsmöglichkeiten bei direkter Mikroskopierung von Kulturen im hängenden Serumtropfen.

Wir sahen verzweigte Fäden, die den in der Literatur abgebildeten und auch gezeichneten Actinomyzesfäden völlig glichen. Es gab Strukturen, die mit kleinen, bis zum Zentrum hin gegliederten Aktinobazillosedrusen sehr gut vergleichbar waren. Feinste Faden-Gewirre stellten sich jedoch als erstarrtes Paraffin heraus, welches sich in unsichtbarer Dünnheit über manche Teile der Deckgläschen von Mikrokulturen ergossen hatte. Alle Präparate, bei welchen Agar, Serum und Blut als Nährmedium und Paraffin und Vaseline zur Befestigung der Deckgläschen u. dgl. verwendet werden und die wochenlang bebrütet wurden, bergen bei Betrachtung unter Ölimmersion eine Unzahl unspezifischer Strukturen im Grössenbereich der Mikroorganismen. Dasselbe gilt auch für nach *Gram* gefärbte Ausstrichpräparate, welche im aufgetragenen Material Serum und andere Eiweiss-Substanzen enthalten. Feinstrukturen, durch Veränderungen kolloidaler Zustände bewirkt, Kristallisationsvorgänge bei Fettsäuren usw. waren in unseren Präparaten durchaus in der Lage, Formelemente anaerober Actinomyceten und aerober Nocardia-Arten in mannigfachster Weise vorzutäuschen. Wir vermuten, dass ein Teil der in der Literatur herrschenden Verwirrung über die Morphologie von Actinomyces bovis (Harz) auf derart hervorgerufenen Beobachtungsfehlern beruht.

Nach Gram gefärbte Ausstriche von Kulturmaterial sind trotz gelegentlichen Fundes von verzweigten Gebilden nur schwache Stützen für die Behauptung, Actinomyces bovis könne wie der humane Typ des W o l f f — I s r a e lschen Keimes sich verästelnde Fäden bilden. Elektronenoptische Untersuchungen junger Kulturen bringen zwar den schlüssigen Beweis solcher Fähigkeiten, jedoch herrschen die unkomplizierten Formen der Kurzstäbchen unbedingt vor. Dennoch dürfen wir unsere Befunde trotz ihrer Seltenheit hoch veranschlagen, denn unsere Technik erlaubte einen Einblick in die in-situ-Verhältnisse. Ausserdem hatten wir sehr junge Kolonien betrachtet, solche also, die nach *Joannidès* [19] u. a. überhaupt noch keine verzweigte Gebilde zeigen müssen.

Uns genügten die bisher angewandten Methoden zur Erkennung der wahren Natur von Actinomyces bovis noch nicht. Gelegentliche Verzweigungen mögen, bekannt oder nicht, in der allgemeinen Entwicklungstendenz auch der Eubakterien liegen. Wir trachteten danach, in ein Medium verbrachte Kurzstäbchen vom Anfang der Bebrütung an daraufhin zu beobachten, ob sie zu irgendeinem Zeitpunkt zu definitiven Fäden und Verzweigungsformen auswachsen können. In diesem Bestreben entwickelten wir 2 neue Kultivierungsverfahren, die auf die Bedürfnisse von anaeroben bis mikroaerophilen Keimen abgestimmt waren. Zu dem an zweiter Stelle beschriebenen Verfahren erhielten wir die Anregung in dankenswerter Weise durch eine Methode, die *Dr. Eduard Florián* in der Budapester Dermatologischen Klinik zur Züchtung von Streptomyceten anwendet.

1. Steriles Serum wird verdünnt oder unverdünnt in den Hohlschliff steriler Objektträger gegeben, nachdem der Rand des Hohlschliffes mit Vaseline umgeben worden ist. In das Serum wird nun ein Bröckchen Kulturmaterial von einer soeben geöffneten *Fortner*schen Platte gebracht. Darauf wird ein grosses, steriles Deckgläschen derart über den Hohlschliff gelegt, dass ein Teil des Serums seitlich durch den Vaselinering hinausgepresst wird. Unbedingt muss dabei ein zu starker Druck auf das Deckgläschen vermieden werden, da dieses sonst infolge seiner Elastizität in der Vertikalen wieder zurückweicht und dabei Serum oder Luft zurücksaugt. Dadurch wird eine bakterielle Verunreinigung des eingeschlossenen »Serumsees« gefördert. Die Ränder des Deckglasses werden schliesslich mit verflüssigtem, wieder erstarrendem Paraffin fest an den Objektträger mit einer *Pasteur*schen Pipette angegossen.

2. Auf einem Objektträger wird die abgesägte, etwa 1 cm hohe Glaskuppe eines 12- bis 15-ccm-Zentrifugengläschens nach der Sterilisierung mit Knetmasse und Paraffin befestigt. Dies muss so geschehen, dass an der Auflagestelle der Glaskuppe auf dem Objektträger zentral von unten her noch Licht ungehindert durchfallen kann. Man formt am besten ein wenig Knetmasse zu einer dünnen Wurst und legt diese in ein bis zwei Windungen um den Grund der fest auf den Objektträger gedrückten Glaskuppe. Nun presst man die Knetmasse fest in den Raum zwischen Objektträger und aufsitzender Glaskuppe hinein. Dabei achtet man auf eine stete Berührung der beiden Gläser, und es bleibt dann von selbst eine kleine, runde, lichtdurchlässige Stelle frei. Mit einer Pipette bringt man jetzt flüssiges Paraffin überall dorthin, wo die Knetmasse Glas berührt. Nach dessen Erkalten sind Glaskuppe und Objektträger genügend stabil miteinander verbunden. Diese und die folgenden Manipulationen sind tunlichst im Schutze einer sterilen Petrischale vorzunehmen, deren Deckel so oft und so lange wie möglich geschlossen wird. Auf ein steriles Deckgläschen legt man inzwischen einen grossen Tropfen sterilen Serums und beschickt ihn mit frischem Kulturmaterial. Sodann gibt man 2 bis 3mal mit einer weiten Platinöse verflüssigten, nur noch 45° warmen Agar über den Tropfen, der diesen, sofort erstarrend, einhüllt. In die Glaskuppe gelangen nun einige Tropfen steriler physiologischer Kochsalzlösung und auf den Rand der Kuppe ein wenig Vaseline. Letztere darf jetzt und später nicht mit der Kochsalzlösung in Berührung kommen, da sie auf deren Oberfläche ein schwimmendes Häutchen erzeugen und den Lichtdurchtritt hindern würde. Durch die Vaseline wird das Deckgläschen so lange festgehalten, bis es durch verflüssigtes Paraffin, welches von unten her an seine Berührungsstelle mit dem Glaskuppenrand gebracht wird, beim Erstarren endgültig fixiert wird. Gute Durchführung dieser Anweisung vorausgesetzt, hält sich der in einer Art feuchter Kammer gleichsam hängende Serumagartropfen trotz 4 bis 6 Wochen langer Bebrütung salbenweich. Der aufgebrachte Agar durchdringt nicht immer den gesamten Serumtropfen. In einzelnen Teilen kann man nämlich Brownsche Molekularbewegung der eingeimpften Keime beobachten. Abb. 6 zeigt ein derart angefertigtes Präparat.

Beide Präparatarten gestatten die mikroskopische Betrachtung mit jedem Trockensystem. Starkes, aber gut abgeblendetes Punktlicht erleichtert das Mikroskopieren. Stichhaltige Ergebnisse können nur dann erzielt werden, wenn sofort nach Fertigstellung solcher Präparate topographische Skizzen der Lage, Randgestaltung und Dichte des eingebrachten Kulturbröckchens angefertigt werden. Diese sollen als Vergleichsgrundlagen für die anschliessende, wenigstens 4 wöchige Bebrütungs- und Beobachtungsperiode dienen. Am 1. und 2. Bebrütungstage entscheidet sich meist schon, ob der hängende Serumagar-Tropfen auch von unerwünschten Saprophyten besiedelt ist.

Nicht alle Stämme konnten wir mittels dieser beiden eben beschriebenen Methoden prüfen. Die notwendige, fast tägliche, längere Beobachtungszeit und das Erfordernis, jedes Präparat im Interesse einer objektiven Befunderhebung genau zu kennen, gebietet die Herstellung einer nur kleinen Anzahl von Präparaten zugunsten einer vollendeten Auswertung. Wir schätzten diesen Teil unserer Untersuchungen so ein, dass ein hierbei erzieltes positives Ergebnis sehr viel Beweiskraft hätte, ein negatives jedoch diejenigen Autoren, die Verzweigungen beobachtet haben, angesichts der kleinen Zahl unserer Präparate (insgesamt 32) wohl nicht hinreichend widerlegen könnte.

In den rund 40 Tage bebrüteten und beobachteten »Serumsee«-Präparaten (Methode 1) zeigte sich an den Rändern der Bröckchen vom 3. Tage an geringes

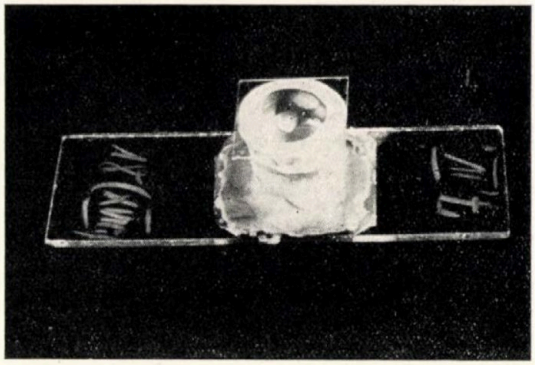


Abb. 6. Hängender Serumagartropfen mit Druse

Keimwachstum. Kurzstäbchen und kokkoide Elemente legten sich den Rändern sozusagen an und leiteten zu losen Netzen aus sich aneinanderlegenden Mikroorganismen über. Wahrscheinlich entstanden solche bei abgeblendetem Licht in allen Tiefen des »Sees« sichtbar werdenden Netze (die »oben« schwimmenden sind sogar der Betrachtung unter Ölimmersion zugänglich) z. T. auch aus beim Einbringen des Materiales abgeschwemmten Einzelstäbchen. Während der Bebrütung konsolidierten sich auch Keiminselchen von grösserer Dichte. Wir stellten in keinem Falle jemals Fäden und Verzweigungen fest. Das hauptsächliche Formelement blieb das Kurzstäbchen. Kokkoide kommen auch zahlreich, Winkelchen und andere abnorm geformte Gebilde sehr selten vor. Nach längerer Bebrütungsdauer treten jene schon aufgezählten unspezifischen und ungeklärten Strukturen auf, die den Kritiklosen zu manchen voreiligen Schlüssen führen können. Auch sich entwickelnde Saprophyten können zu Täuschungen Anlass geben.

In hängenden Serumagartropfen (Methode 2) bilden sich kaum Netze und Inselchen. Die Bröckchen vergrössern sich allgemein durch Wachstum immer neuer Kurzstäbchen. Vom 14.—17. Tage an traten jedoch an einzelnen Stellen

kurze Reihen kokkoider Elemente auf, ähnlich starren geraden Streptokokkenketten. Es blieb unerkenntlich, ob es sich hierbei um Fäden handelte, von denen nur lichtbrechende Innenkörperchen sichtbar wurden, oder ob die Kurzstäbchen und kokkoiden Elemente anfingen, ihren Zusammenhang auch nach den Teilungsvorgängen zu wahren. Innerhalb einer 35tägigen Bebrütungszeit traten auch in diesen Präparaten keine ausgesprochenen Fäden oder gar Verzweigungen auf.

Obwohl wir somit unsere Stämme den vielseitigsten Bedingungen unterwarfen, konnten wir zu keinem Zeitpunkt der ausgedehnten Bebrütungsperioden Wachstum von Fäden und verzweigten Gebilden in direkter Verbindung mit verimpften Kurzstäbchen nachweisen. Jedoch sahen wir solche Strukturen in höchst geringer Zahl in nach Gram gefärbten Ausstrichen von Kulturmaterial aus *Fortner*platten und, in grösserer Menge, in Serumbouillon, die nur mit Kurzstäbchen beimpft worden waren. Den mikrobiologisch exakten Nachweis eines sehr beschränkten Verzweigungsvermögens — jedenfalls unter den von uns gebotenen Kulturbedingungen — erbrachten wir dann durch die elektronenmikroskopische Betrachtung junger in-situ-Kolonien von Actinomyces bovis. Viele kokkoide Elemente sind bei älteren Kulturen zu sehen. Ihr Zusammenhang mit den anfärbbaren Granula absterbender Keime ist sehr wahrscheinlich. Die Literatur verzeichnet keinerlei erfolgreiche Versuche, die es erlauban würden, ihnen einen Sporen-Charakter zuzuschreiben. So weisen schon *Wolff* und *Israel* [50, 51] *Boströms* Sporenhypothese zurück, ohne freilich selbst mehr sagen zu können, als dass diese Kokkenformen nach Fädenzerfall zurückbleiben, und dass man sie weder mit echten Kokken noch mit Sporen noch mit Zelldetritus oder Kunstprodukten in Verbindung bringen dürfte. Nie sahen wir Lufthyphen- und Gonidienbildung — auch dann nicht, wenn wir geöffnete *Fortner*platten, ohne dass die Kulturen abstarben, noch 24 Stunden aerob bebrüteten. Es treten keinerlei besonders organisierte Fruktifikationsorgane auf. *Der Umgang mit Kulturmaterial von Actinomyces bovis vermittelt mehr oder weniger nur das Bild eines zur Bildung von Coryneformen neigenden, pleomorphen, grampositiven, mikroaerophilen Bakteriums im engeren Sinne.*

IV. Die Drusen

Es gelang uns, die kulturell-biochemischen Eigenschaften von Actinomyces bovis und die unter den verschiedenen Züchtungsbedingungen vorkommenden morphologischen Strukturen mit einiger Bestimmtheit festzulegen. Auf Grund eigener Beobachtungen können wir uns den Feststellungen der veterinärmedizinischen Forscher weitgehend anschliessen und aus den in der Literatur vorliegenden zahlreichen ausgezeichneten Beschreibungen des humanen Types des *Wolff—Israel*schen Mikroorganismus folgern, dass sich der bovine Typ insbesonders kulturell vom Erreger der humanen Aktinomykose unterscheidet. Dennoch eröffnet sich eine neue Problematik. Bei aller Unklarheit

nämlich über die Natur der Drusen im aktinomykotischen Gewebsprodukt bleibt es eine gar nicht erst besonders diskutierte Feststellung, dass sowohl die Drusen beim Menschen als auch diejenigen bei der Knochenaktinomykose des Rindes in der Struktur gleichartig sind. Weder *Wright* [52], der 13 humane und 2 bovine Fälle untersuchte, noch beiderlei Arten untersuchende andere Autoren fanden erwähnenswerte Unterschiede. Weitere Klarheit über den Charakter der Drusen zu schaffen, bedeutet demnach ohne Rücksicht darauf, ob dies durch Arbeit mit humanen oder animalen Funden geschieht, weitere Klarheit auch über beide Erreger-Typen zu erzielen.

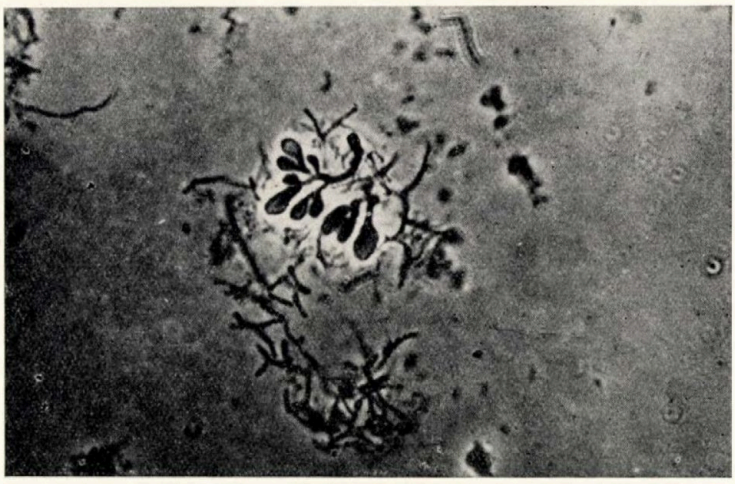


Abb. 7. Actinomyces bovis. Teile einer zerquetschten Druse in KOH-Lösung eingelegt. Ölimmersion. Phasenkontrastmikroskop (750 : 1)

Das Vorkommen des *Wolff—Israel*schen Keimes in der Druse steht fest. Viele Autoren züchteten ihn aus mehrfach gewaschenen Drusen, bei denen durch 2 bis 3wöchiges Liegenlassen in sterilen Röhrchen (*Wright* [52]) oder durch 2minutiges Einlegen in Alkohol (*Mackie* und *McCartney* [31]) die Begleitkeime abgetötet wurden. Auch wir züchteten gelegentlich aus gewaschenen Drusen, erhielten allerdings dabei nie — wie *Wright* [52] vielfach — sofort Reinkulturen. *Wolff* und *Israel* [50, 51] sind auf Grund ihrer Tierversuche überzeugt, dass aus eingeimpften Kurzstäbchen nach Vermehrungsprozessen unmittelbar Drusen entstehen. *Wright* [52] sieht Kolbenbildung in Serum und Pleuritisflüssigkeit, und *Naelsund* [37] legt den Beginn der Drusenbildung auf den 10. bis 12. Tag p. i. fest. Zu makroskopischer Grösse entwickelten sich die Drusen in etwa 3 bis 4 Wochen.

Fäden und verzweigte Strukturen, dazu Kolben, sind die wichtigsten Formelemente der Knochenaktinomykose-Druse. Sie lassen sich photographisch in zerrissenen Drusen nach Aufhellung in 10%iger KOH nachweisen (Abb. 7).

In zehnmal gewaschenen, dann zerdrückten, ausgestrichenen und nach Gram gefärbten Drusen lassen sich die in der Kultur zu sehenden typischen Bakterienformen keinesfalls in bedeutender Menge oder mit Regelmässigkeit auffinden. In solchen Präparaten sieht man vielmehr in mässiger Anzahl winkelige und fädige, seltener auch echt verzweigte Gebilde. Unsere Handzeichnung bringt eine Auswahl davon (Abb. 8). Immer finden sich auch, wenn auch in unerwartet geringer Zahl, Kolben, die entweder homogen gramfest gefärbt sind oder einen gramnegativen, gegengefärbten Saum haben. Die Fäden, Verzweigungen und Winkelformen entsprechen in ihren Abmessungen den Gebilden aus Kulturmaterial. Nur sind sie öfter miteinander verklebt, bizarrer und hin und wieder in stärkere Haupt- und schwächere Nebenäste differenziert. Kurzstäbchen und

Abb. 8. Actinomyces bovis. Aus zerdrückter Druse. Gramfärbung. Ölimmersion (Handzeichnung)

jene komplizierteren Formen in Direktausstrichen aktinomykotischen Eiters zu entdecken, gelang trotz positiver Kulturversuche mit demselben Material nicht (zusammen 80 Präparate von frischen Aktinomykomen). Aus all dem Gesagten schliessen wir: Der *Wolff—Israel*sche Keim nimmt im aktinomykotischen Gewebe eine besondere Wachstumsform ein, die nicht so sehr Äusserung einer inneren Entwicklungstendenz zu sein scheint, sondern offenbar durch die biologische Infektionsabwehr des Makroorganismus notwendig wird. Bei dieser Auffassung kann die Beschäftigung mit den Drusen unsere Arbeit weniger im Sinne der Beantwortung der Frage beeinflussen, ob es sich um Bakterium im engeren Sinne oder Actinomyzet (Streptomyzet) handelt, sondern dient nur dazu, den Namen »Actinomyces bovis (Harz)« mit der Vorstellung eines möglichst allseitig definierten Mikroorganismus zu verbinden.

Alle Autoren, die sich mit dem *Wolff—Israel*schen Keim befassen, drängt es auch zu einer Stellungnahme über die Natur der Drusen. Drusen werden bekanntlich nicht nur durch den *Wolff—Israel*schen Keim bzw. durch den Actinomyces bovis verursacht, sondern kommen auch bei anderen Infektionen vor. So werden — in ihrem Bau allerdings anders geartete — Drusen (Abb. 9) durch Actinobacillus Lignièresi [*Lignières* und *Spitz* 28, 29], durch Staphylokokken

[*Magrou* 34, *Hülphers* 17], Tuberkulosebakterien [*Coppen—Jones* 6, 7], aerobe Streptothrixarten [*Dresel* 9, 10], Monilia albicans [*Magrou* 34] und Pseudotuberkulose-, Rotz- und Diphtheriebakterien [*Radke* 41] bedingt.

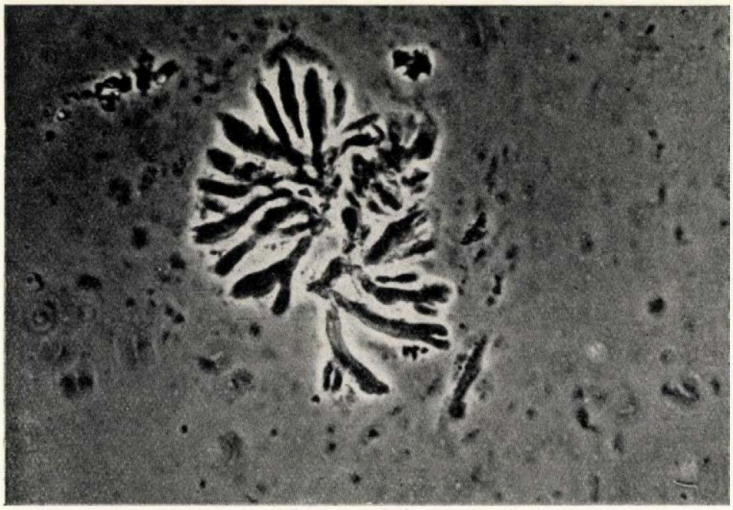


Abb. 9. Aktinobazillose. Druse in KOH-Lösung eingelegt. Phasenkontrastmikroskop; Aufnahme von Th. Szent Iványi (750 : 1)

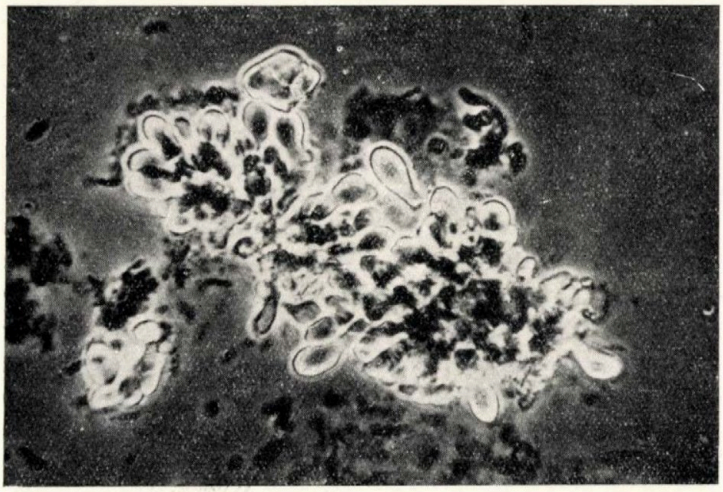


Abb. 10. Actinomyces bovis. Druse in KOH-Lösung eingelegt. Phasenkontrastmikroskop; Aufnahme von Th. Szent Iványi (750 : 1)

Jedes unserer 15 Knochenaktinomykome enthielt im Eiter massenhaft Drusen, die innerhalb der ersten drei Tage nach Schlachtung der Tiere mit Leichtigkeit im mit 10%iger KOH bereiteten Nativpräparat mittels schwachen Trockensystems gefunden und mittels starken genauer untersucht werden

konnten. Einen vorzüglichen Einblick in den Aufbau der Drusen gestatten derartige Nativpräparete auch unter Ölimmersion im Phasenkontrastmikroskop (Abb. 10). Vom 3. bis 5. Tage des Kühlschrank-Aufenthaltes unserer Aktinomykome wurde es schwerer, noch intakte Drusen aufzufinden. Besonders brachen die Kolben nun leicht ab. Zehnmal gewaschene Drusen, die, in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert, viele Wochen im Kühlschrank gehalten wurden, waren kolbenlos geworden. Die Kolben selbst aber blieben als Einzelelemente völlig erhalten. Im Elektronenmikroskop erwiesen sie sich als ganz und gar homogen. Im Phasenkontrastmikroskop erhielten wir von ihnen differenziertere Bilder.

Wir bebrüteten gewaschene Drusen verschiedener Aktinomykome auf *Fortner*schen Mikroplatten, später mit besserem Erfolg noch in hängenden

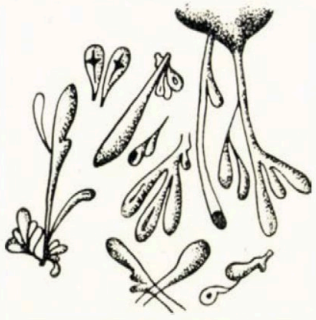


Abb. 11. Actinomyces bovis. Kolben aus Drusen. Eingelegt in KOH-Lösung. Ungefärbt. Ölimmersion (Handzeichnung)

Serumagartropfen. In etwa 10% unserer zahlreichen Präparate konnten wir im Verlauf einer mehr als einmonatigen Bebrütungszeit Veränderungen der Drusen konstatieren, die nicht lediglich das Ergebnis von Austrocknung waren. Von den zahlreichen Beobachtungsfehlern sprachen wir schon an anderer Stelle. Wir berichten im folgenden nur von den sicheren Befunden.

Einwandfrei zu beobachten ist hin und wieder ein Wachstum von Kurzstäbchen und kokkoiden Elementen aus der Druse heraus. In einem Fall stellten wir mit Sicherheit die Neuentstehung von Kolben fest. Schliesslich kann man in beschränktem Masse Wachstum von Kolben und Fäden sehen. Die grösste Zahl der Präparate aber bleibt negativ oder zeigt ein vermeintliches Wachstum von Kolben dadurch, dass sich auf der *Fortner*schen Mikroplatte die Ränder der Drusen passiv infolge von Eintrocknung zurückziehen. In solchen Fällen ragen nämlich einzelne rigide Kolben immer weiter über den Rand hinaus. Wären keine topographischen u. dgl. Skizzen von den Drusen am Anfang gemacht worden, so hätte es zu den bedauerlichsten Fehlurteilen kommen können. Immerhin gestatteten gerade solche an sich unwillkommene Vorgänge einen Einblick in den Formenreichtum der Keulen und Kolben (Abb. 11 u. 12).

Schieben sich nach 10 bis 12tägiger Bebrütungszeit Zungen von Kolben oder Stäbchen und Fäden hervor, so hört dieser aktive Wachstumsprozess, soweit wir beobachteten, nach kurzer Zeit schon wieder auf, und zwar dann für immer. Das Wachstum beginnt immer unvermittelt und geht intensiv vor sich. Abgerissene, am dünnen Rande des Serumagartropfens liegende Drusen-

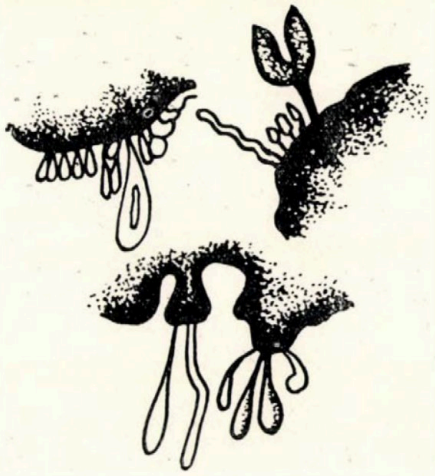


Abb. 12. Actinomyces bovis. Kolben von Drusen im hängenden Serumagartropfen. Starkes Trockensystem. (Handzeichnung)

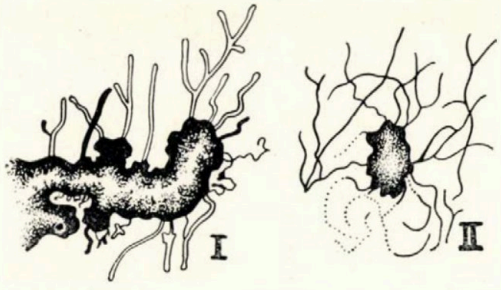


Abb. 13. Actinomyces bovis. I: Drusenteil mit herauswachsenden Fäden im hängenden Serumagartropfen. Starkes Trockensystem. II: Drusenteil mit Wachstum z. T. granulierter Fäden im hängenden Serumagartropfen. Starkes Trockensystem. (Handzeichnung)

teile können nach 4wöchiger Bebrütung beginnen, sich nur höchst selten verzweigende Fäden von 2 bis 3facher Länge des Drusenteil-Durchmessers in das Medium zu entsenden. Da die Fäden nicht in einer Ebene liegen, ist nur immer einer von ihnen scharf zu photographieren. Wir bringen daher eine instruktivere Handzeichnung (Abb. 13, I). Photographisch belegen möchten wir jedoch eine Beobachtung, wonach an ein und derselben Druse sich 2 Kolben fingerartig vorschoben und an anderer Stelle Fadenwachstum eintrat. Wir

stellten das Mikroskop auf die Kolben scharf ein und konnten daher das Fadenwachstum rechts von diesen Gebilden nur unscharf abbilden (Abb. 14). Eine Anzahl der Keulen ist stets nur bei ständigem Spielen der Mikrometerschraube um manchmal mehr als eine ganze Umdrehung in ihrer völligen Ausdehnung zu sehen. Es geschieht gar nicht zu selten, dass entstandene Kolben wieder unsichtbar werden. Die Befunderhebung ist daher sehr mühsam und zeitraubend und hat wissenschaftlichen Wert nur dann, wenn alle nicht völlig klaren Phänomene rücksichtslos aus dem Bereich der Betrachtungen ausgeschieden werden. Gerade angesichts so zahlreicher Unklarheiten und Deutungen

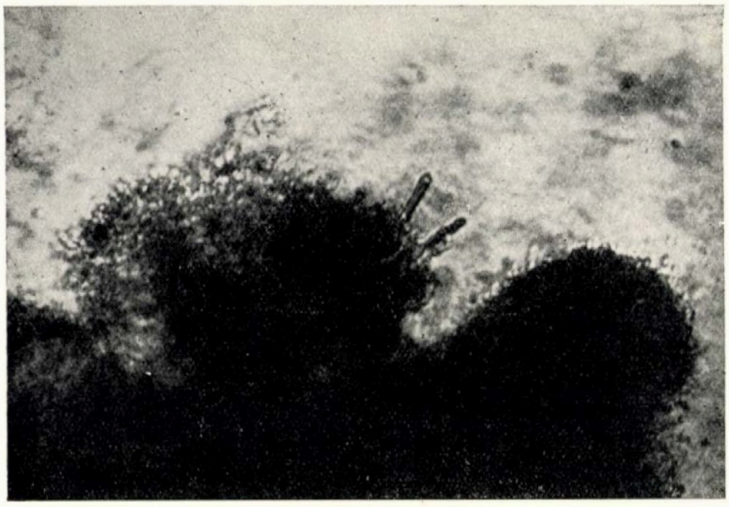


Abb. 14. Actinomyces bovis. Druse im hängenden Serumagartropfen. Kolben- und Fädenwachstum. Trockensystem (2000 : 1)

in der ätiologischen Aktinomykoseforschung möchten wir auch in Verbindung mit den Ergebnissen dieser Art Präparate zur Zurückhaltung bei Urteilen und Schlüssen mahnen. Einwandfrei dokumentarisch belegen können wir mit Abb. 15 das Vorschieben einer Wachstumszunge von Kurzstäbchen aus einer Druse, an deren äusserem, also die Wachstumsspitze bildenden Rande sich 3 Kolben bildeten. Die 2 kleinsten davon hat die Photographie erfasst. Ebenso wie bei den anderen photographisch oder zeichnerisch belegten Beispielen sind wir sicher, hier keinen Täuschungen durch passive Vorgänge zum Opfer gefallen zn sein.

Nicht photographierbar, weil nur mit starkem Trockensystem und abgeblendetem starkem Punktlicht sowie unter dauernder Bewegung der Mikrometerschraube sichtbar werdend, war ein einwandfreies Netz sich verzweigender dünnster Fäden, das aus der Druse hervorkam und von uns erst am 54. Tage der Bebrütung einer Druse aus Aktinomykom 14 festgestellt wurde. Es war

dies ein um so interessanterer Befund, als hier Teile der unseptierten Fäden, soweit sie in Drusennähe lagen, perlenschnurartig aufgereihte, lichtbrechende Kügelchen enthielten, die den Faden nicht ausweiteten (Abb. 13, II). Solche Gebilde werden von *Wolff* und *Israel* [50, 51] beschrieben und diskutiert.

Wir beurteilen unsere Drusenpräparate dahingehend, dass *wir mit ihrer Hilfe in einigen wenigen Fällen photographisch belegbare aktive Wachstumsveränderungen von Drusenelementen demonstrieren konnten.* Schärfster Kritik darf dabei der in Abb. 14 festgehaltene Vorgang des aus einer Druse heraus erfolgten Keim- und Kolbenwachstums standhalten. Zu den anderen Erschei-

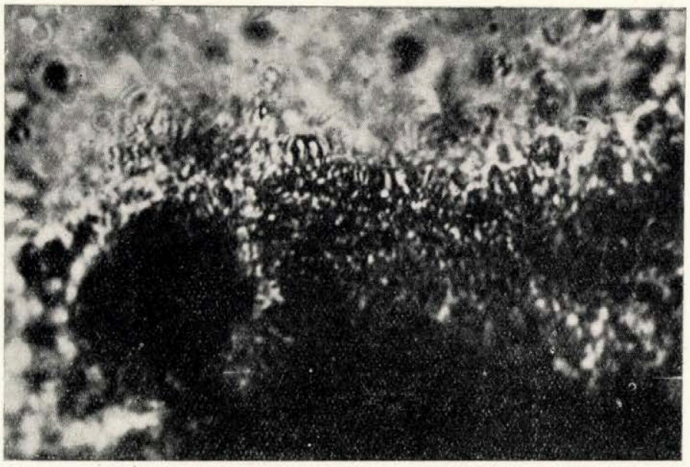


Abb. 15. Actinomyces bovis. Druse im hängenden Serumagartropfen. Kolben- und Fädenwachstum. Trockensystem (2000 : 1)

nungen darf der berechtigte Einwand gemacht werden, dass die wachsenden Formelemente unter Umständen auf gleichzeitig in den Drusen enthaltene aerobe Nocardia- und Streptomyzesarten, die auch das sterile Waschen der Drusen nicht beseitigen konnte, zurückzuführen seien. Da wir die betreffenden Drusen speziell nicht einer aeroben Kontrolle unterziehen konnten und anderseits eine Abimpfung von Wachstumselementen aus dem hängenden Serumagartropfen mittels Mikromanipulator ein negatives Ergebnis hatte, können wir solchen Einwänden nur entgegenhalten, dass im hängenden Serumagartropfen mikroaerophile bis anaerobe Verhältnisse herrschen.

Es steht in keinem Widerspruch zu den genannten Autoren, wenn *wir als Grundlage der Druse aus dem Knochenaktinomykom des Rindes Actinomyces bovis (Harz) ansehen.* In der Peripherie seiner auch echte Verzweigungen in geringer Zahl enthaltenden mycelartigen Zusammenballungen kann im lebenden Gewebe oder in serumhaltigen Nährböden ein Wachstum in der Form vorkommen, dass weitere Keimmengen aus Lücken im Kolbenmantel zungenförmig her-

vorwachsen und als Unterlage für Abscheidungen von Gewebe- und Serum-Substanzen dienen können. Dadurch entstehen weitere echte Kolben. Dieser Vorgang stellt sich unter Bedingungen ein, die wir im einzelnen nicht kennen. Nur eine sehr grosse Anzahl von entsprechenden Präparaten kann den experimentellen Nachweis der Entstehung solcher Gebilde bringen. Die Keim-»Zungen« sind wahrscheinlich identisch mit den oft beschriebenen Wurzelfäden der Drusen. Brachten wir gewaschene Drusen auf *Fortner*sche Mikroplatten, so zeigten sich ihre massiven Zentren, ähnlich wie bei in Hühnereiern erhaltenen Kolonien, von einer Art »Pseudonetz« umgeben. Dabei handelte es sich offenbar auch um solche Keimzungen, »Wurzeln«, deren nicht fädige Einzelelemente durch Gewebs- oder Eiweissstoffe verklebt werden. *Winkle* [65] bringt eine Abbildung eines derartigen »Wurzel«-Geflechtes im Gewebe.

*

Tierversuche lagen nicht im Rahmen unserer Arbeit. Wir infizierten lediglich 2 Meerschweinchen intraperitoneal mit einer Suspension einiger unserer Stämme in physiologischer Kochsalzlösung. Die nach 63 Tagen bei klinischer Gesundheit getöteten Tiere waren völlig frei von spezifischen pathologisch-anatomischen Veränderungen. Wir hatten nicht, wie *Wolff* und *Israel* [50, 51] und *Grooten* [53], Agar mitappliziert. Letzteres ist vielleicht eine Voraussetzung für den positiven Ausfall des Tierversuches.

Nomenklatur und Systematik

Dem Mikrobiologen kommt bei Fragen der Systematik nicht die Wissenschaft der Anatomie, Embryologie und Paläontologie zu Hilfe, wie das beim Zoologen und Botaniker der Fall ist. Die Eigenschaften seiner Forschungsobjekte, insbesondere auch die morphologischen und kulturell-biochemischen, sind äusserst variabel. Ökologische Momente wirken oft tiefgreifender als bei höher organisierten Lebewesen ein. Eine Konstanz der Spezies widersprecht dem Entwicklungsgedanken. Die Mikrobiologie ist noch weit davon entfernt, ein natürliches System der Kleinstlebewesen aufstellen zu können.

Dennoch gibt es namhafte Versuche, eine als Arbeitsgrundlage zu verwendende Systematik zu schaffen [*Bergey*'s Manual 1 ; *Lehmann* und *Neumann* 24 ; *Krassilnikow* 23 u. a.].

Beim Versuch der Einordnung von Actinomyces bovis (Harz) in eines der Systeme wird der Mangel an einheitlichen und abschliessenden Definitionen wesentlicher Eigenschaften dieses Mikroorganismus besonders drückend empfunden. Die Frage der Bezeichnung des Keimes ist nur in Verbindung mit seiner Einreihung in das System der Mikroorganismen zu diskutieren.

Radike [41] spricht ebenso wie *Manninger* [35] von Actinomyces bovis als von einem Corynebakterium. *Haupt* und *Zeki* [16] halten den Erreger der Knochenaktinomykose des Rindes

ebenso für ein Corynebakterium, wollen aber, um Verwirrung zu vermeiden, als Gattungsnamen »Actinomyces« und als Bezeichnung für die Typenart »Actinomyces bovis Harz em. Boström 1891« beibehalten. *Wright* [52] und andere Autoren bleiben hingegen bei »Actinomyces bovis (Harz)« und reservieren diesen Namen für den *Wolff—Israel*schen Keim. »Cohnistreptothrix« wurde im älteren französischen Schrifttum viel verwendet. Damit sollte der *Wolff—Israel*sche Keim von den »Euactinomyceten«, den »typischen« aeroben Aktinomyceten (gemeint waren die Nocardien und Streptomyceten!) nachhaltig unterschieden werden. *Lieske* [26, 27] aber weist eine solche Unterscheidung zurück. *ørskov* [40] vereinigt Corynebakterien und Mykobakterien mit den *Wolff—Israel*schen in der Gruppe II/b seiner Aktinomyceten-Einteilung. Eine Zusammenstellung dieser Gattungen findet sich u. a. auch bei *Lehmann* und *Neumann* [24], *Pribram* (zit. bei *Bergey* 1) und *Habs* [15]. *Bergeys Manual* [1] gibt Actinomyces bovis (Harz) einen eigenen Spezies-Charakter. *Grooten* [53] gebraucht zwar »Actinomyces Israeli«, will darunter jedoch ein Bakterium verstanden wissen. Eine Kompromisslösung stellt »Actinobacterium« dar. Es existieren u. a.: »Actinobacterium Israeli (Kruse) Sampietro (1908)« und »Actinobacterium israeli var. spitzi (Lignières) Sampietro (1908)« : *Joannidès* [19]. *Linhard* [30] und *Brion, Goret* und *Joubert* [4] verwenden ebenfalls den Namen »Actinobacterium«. Auch »Proactinomyces« wird vorgeschlagen. Man findet : »Proactinomyces israeli Negroni« und »Proactinomyces israeli Henrici«. Bei *Habs* [15] zählen zu den Proaktinomyceten auch die Myko- und Corynebakterien. *Krassilnikows* [23] Gruppe der Proaktinomyceten umfasst allerdings ein ausserordentlich inhomogenes Material. »Streptothrix Israeli«, neuerdings wieder von *Koljakow* [21] gebraucht, ist ungerechtfertigt, da wir damit die Vorstellung vorwiegend aerober Spezies verbinden. Veraltet sind die Bezeichnungen »Streptothrix spitzi Lignières« und »Discomyces« [*Brumpt* 5]. *Dahmen* [8] geht überhaupt nicht auf die Problematik der Nomenklatur ein. Entschieden zu weit gehen *Kelser* und *Schoening* [54], wenn sie Rotlaufbakterien und *Wolff—Israel*sche Keime in dieselbe Familie (Actinomycetaceae) stellen. Keime, die vor *Wright*s [52] Klarstellung oder vor Kenntnis der Keime *Wolff*s und *Israel*s zum Teil als »Actinomyces bovis« beschrieben wurden, sollen nach *Topley—Wilson*s [46] Vorschlag jetzt »Actinomyces graminis (Boström)« genannt werden.

Unsere eigenen Untersuchungen erlauben uns, Actinomyces bovis (Harz) wie folgt zu charakterisieren :

1. Verhalten im mikrobiologischen Kulturversuch wie ein Bakterium im engeren Sinne.
2. Grosse morphologische und tinktorielle Ähnlichkeit mit Corynebacterium pyogenes.
3. Bildung von Fäden und echten Verzweigungen in Kulturen sehr selten.
4. Rasche Degeneration der Kurzstäbchen in Kulturen, wobei ihrem Wesen nach ungeklärte kokkoide Formen besonders häufig vorkommen.
5. Ausgeprägte Mikroaerophile, später steigende O_2-Toleranz.
6. Keine Säurefestigkeit.
7. Experimentell gesicherte Beteiligung am Aufbau von Kolbendrusen.
8. Bildung eines auch echte Verzweigungen enthaltenden Fadengeflechts nur in der Eigenschaft als bakterielles Zentrum einer Druse.
9. Unter keinen Lebensbedingungen werden Lufthyphen oder Sporen und besondere Fruktifikationsorgane gebildet.
10. Die vorherrschende Kurzstäbchenform in Kulturen ist nicht das Ergebnis des Zerbrechens (hypothetischer) Aktinomycesfäden, sondern Ergebnis eines konsequent bis zum Ende gehenden Teilungsmechanismus.

Ganz sicher darf Actinomyces bovis (Harz) nicht zu den Nocardia-Arten, zu den Streptomyceten oder zu irgendeiner Hyphomycetengruppierung gerechnet werden. Nocardia-Arten, im alten Schrifttum oft Streptotricheen genannt, wachsen immer aerob und bilden in älteren Kulturen definitive Sporen. Die

Streptomyzeten zeichnen sich durch grosse Konstanz ihrer Fäden aus. Die Hyphomyzeten haben kräftigere, septierte Fäden und sind sporenbildend. Mit den Vertretern der Ordnung »Actinomycetales« teilt Actinomyces bovis (Harz) den einfachen Bau, den geringen Dickendurchmesser und die Vielseitigkeit der Ernährungsverhältnisse. Auch die geringe Konstanz gewisser morphologischer Elemente ist beiden gemeinsam. *Kolle—Hetsch* [22] führen tatsächlich für die Actinomycetales eine lange Reihe von Eigenschaften an, die auch bei unseren Stämmen nicht vermisst wurden.

Andererseits können die Corynebakterien auch Verzweigungen zeigen, wie *Haupt* und *Zeki* [14] sowie *Steck* [44] angeben. Nach *Bergey*'s Manual [1] soll diese Verzweigung allerdings nur scheinbar sein. In Wirklichkeit beruhe die Anordnung der Keime auf der Wirkung einer sog. »snapping division«. Uns scheint, dass es unter den Corynebakterien viele Vertreter gibt, die noch nicht befriedigend mikrobiologisch definiert sind. Tatsächlich enthält die Literatur Beschreibungen von Keimen, die die Entscheidung schwer machen, ob es sich um Corynebakterien und Übergänge zu den *Wolff—Israel*schen Keimen oder um *Wolff—Israel*sche mit Übergängen zu den Corynebakterien handelt. Unsere eigenen Stämme sind bis zu einem gewissen Grade selbst ein Beispiel dafür. Dies gilt unserer Meinung nach auch für solche Mikroorganismen wie diejenigen, die *Pinoy* [55], *Bujwid* [56], *Bieberdorf* [56], vielleicht auch *Rullmann* [57] und *Kämpe* [58] in einzelnen Fällen fanden, schliesslich auch für die Keime, welche als Actinobacterium negri, abszessus und cellulitis (*Linhard* 30) und Actinobacterium Baudeti (*Brion, Goret* und *Joubert* 4) bezeichnet werden. Teile der Beschreibungen, gerade auch sehr wesentliche, wie z. B. morphologische Feststellungen, erinnern sehr an *Glages* [14] Darstellungen der Corynebakterien. Differentialdiagnostische Arbeiten müssten an all diesen Keimen einschliesslich Corynebacterium-pyogenes-Arten und Actinomyces-bovis-Stämmen mit den Methoden der Mikrobiologie noch vorgenommen werden und könnten der systematischen Einordnung auch unserer bovinen Stämme förderlich sein.

Innerhalb der Ordnung »Actinomycetales«, jedoch ausserhalb der Familie »Actinomycetaceae« und auf jeden Fall natürlich auch ausserhalb der Familie »Streptomycetaceae«, könnte Actinomyces bovis nur noch Aufnahme bei den »Mycobacteriaceae« finden. Die von uns beobachteten Formen, besonders auch der »Granula«, lassen dies nicht so abwegig erscheinen. Indessen verfügt die Familie der Mycobakterien nur über eine Gattung, und diese vereinigt aerobe säurefeste Spezies von grosser Ähnlichkeit.

Wir stützen unsere eigene Stellungnahme unbefangen auf die vorstehend in 10 Punkten beschriebenen Eigenschaften der selbst studierten Erreger der Knochenaktinomykose des Rindes. *Dabei bleiben wir weiterhin bei dem Namen »Actinomyces bovis (Harz)«*, und zwar ohne Rücksicht darauf, ob *Harz* diesen Keim in der Hand hatte oder nicht. Wir dürfen deswegen so verfahren, weil

unterdessen alle Arten, die früher als aerobe Actinomyzeten, Streptotricheen und dgl. bezeichnet wurden, als Nocardia- und Streptomyzes-Spezies genau definiert worden sind und wir unter »Actinomyces« eben nur noch die anaeroben bis mikroaerophilen Keime von der Art der *Wolff—Israel*schen zu verstehen brauchen. Weder völlig mit Corynebakterien identifizierbar noch auch nur annähernd zu Nocardia- und Streptomyzes-Arten zu stellen, möchten wir lediglich diejenigen aus Knochenaktinomykosen des Rindes stammenden, gegebenenfalls noch beim Schwein und saprophytisch in der Mundhöhle gefundenen Keime als Actinomyces bovis (Harz) anerkennen, die weitgehend die Eigenschaften unserer Stämme zeigen. Es ist noch nicht an der Zeit, darüber zu diskutieren, ob die Ordnung, welche Nocardia- und Streptomyzes-Arten ebenso wie Mykobakterien und Actinomyces bovis (Harz) enthält, wirklich nur in ihr zu vereinigende Vertreter birgt. Insbesondere wird die Frage gestellt werden müssen, ob es zweckmässig ist, diese Ordnung weiterhin gerade »Actinomycetales« zu nennen. Sind die Nocardia-Arten und die Streptomyzeten Bindeglieder zu den Hyphomyzeten, so *leitet Actinomyces bovis (Harz) zu den Bakterien im engeren Sinne, den Eubacteriales, über.* Ob unser Keim eine eigene Spezies oder nur einen Typ des *Wolff—Israel*schen Keimes darstellt und im letzteren Falle durch seine Daseinsbedingungen im Rinderkörper zustande gekommen sein dürfte (in der freien Natur hat man ihn noch nicht gefunden), wollen wir noch nicht entscheiden. Trotz Bemühung konnten wir keinen humanen *Wolff—Israel*schen Keim bekommen, so dass wir vergleichende Untersuchungen nicht vornehmen konnten. *Hinsichtlich der systematischen Stellung von Actinomyces bovis (Harz) halten wir eine enge Nachbarschaft zu Coryne- und Mykobakterien für gerechtfertigt.* Genauere Feststellungen würden eine über das Ziel dieser Arbeit hinausgehende kritische Besprechung aller mikrobiologischen Systematik-Versuche voraussetzen.

ZUSAMMENFASSUNG

Wir isolierten aus 15 Knochenaktinomykomen des Rindes Actinomyces bovis (Harz) und unterwarfen 14 der gewonnenen Stämme einer genauen Betrachtung.

Alle Stämme verhalten sich darin gleich, dass sie mit Hilfe der üblichen mikrobiologischen Untersuchungsmethoden von Bakterien im engeren Sinne kaum unterschieden werden können Immerhin sind selbst in Gram-Ausstrichpräparaten von Kulturmaterial einzelne echte Verzweigungsformen feststellbar. Solche Strukturen lassen sich auch im elektronenoptisch gewonnenen Bild von in-situ-Kolonien nachweisen. Die Grundform von Actinomyces bovis (Harz) ist aber unter allen Bedingungen das grampositive, pleomorphe Kurzstäbchen.

Der genauen Feststellung der morphologischen Organisation des Erregers der Knochenaktinomykose des Rindes in der Druse stellen sich zahlreiche Hindernisse entgegen. Einwandfrei demonstrierbar ist jedoch die Entstehung von Kolben in einer Wachstumszone von Kurzstäbchen. Zahlreiche andere Wachstumsphänomene sind zwar in einem geringeren Prozentsatz der Präparate zu beobachten, jedoch entbehren in dieser Hinsicht die Drusenpräparate in unvermeidbarer Weise des exakten Nachweises, dass Actinomyces bovis (Harz) in Reinkultur in ihnen vorliegt.

Die Kulturen bedürfen anaerober bis mikroaerophiler Verhältnisse. In Subkulturen stellt sich eine durch Eikultur noch zu steigernde grössere Sauerstoff-Toleranz heraus. Das *Fortner*sche Prodigiosum-Plattenverfahren ist das optimale für die Erstzüchtung des Keimes aus Unter-

suchungsmaterial. Die Inkubationszeit bis zum Erscheinen makroskopischer Kolonien bei Primär- und Subkultur wird festgelegt. Sie ist am kürzesten bei Züchtung auf mit Kollodiummembran überzogener *Fortner*platte (12 bis 16 Stunden). Eine geringe, aber genügend deutliche Hämolyse steht in Abhängigkeit von Blutart und Blutkonzentration im Medium. Die Förderung des Wachstums durch Kohlensäure ist angedeutet, praktisch jedoch kaum ins Gewicht fallend. Einzelne, länger fortgezüchtete Stämme vermögen unter den Bedingungen des nach dem *Preisz*schen Anaeroben-Verfahren geschlossenen Schrägnährbodens in Röhrchen koaguliertes Schafserum zu lösen. Gegenüber Glukose,Laktose, Saccharose und schwächer gegenüber Lävulose und Maltose besteht in Peptonwasser mit Serumzusatz fermentative Aktivität ohne Gasbildung. Krankenseren vom Rind zeigen selbst mit dem homologen Stamm einen nur geringen Agglutinationstiter ; von Kaninchen lassen sich wirksame Immunseren gewinnen. Säureextrakte der Stämme sind herstellbar. Ihre Reaktion mit unseren Immunseren war schwach. Beide serologischen Untersuchungsverfahren ergaben keine Anhaltspunkte für wesentliche Unterschiede im Antigenaufbau unserer Stämme.

Für die Untersuchung der Drusen während langer Bebrütungsperioden wird eine besondere Technik angegeben, die sich auch zur Beobachtung des Wachstums von Kulturmaterial eignet. Die exakte Befunderhebung kann durch eine Anzahl Fehlerquellen gefährdet werden, die sich durch Veränderung der eiweisshaltigen Nährmedien nach langen Bebrütungszeiten im mikroskopischen Grössenbereich ergeben.

Actinomyces bovis (Harz) zeigt keinesfalls diejenigen Merkmale, welche wir gemeinhin von »Aktinomyzeten« erwarten. Da leztere jedoch neuerdings ihre nähere Bestimmung als Nocardia-Arten und Streptomyzeten erfahren haben, bleiben wir nach gründlicher Würdigung der gesamten einschlägigen Literatur bei dem Namen *Actinomyces bovis (Harz)*. Mangels eigener Untersuchungen humaner Stämme, enthalten wir uns einer Stellungnahme dazu, ob unsere Keime eine selbständige Spezies darstellen. Tatsächlich weisen viele Momente darauf hin. Im System der Mikroorganismen wollen wir Actinomyces bovis (Harz) nur einen ungefähren Platz zuweisen, da wesentliche Fragen der Systematik noch nicht allgemein gelöst sind.

LITERATUR

1. *Bergeys* Manual of Determinative Bacteriology, VI. edit. Baltimore (1948).
2. *Bongert :* Bakteriologische Diagnostik. 3. Aufl. Leipzig (1912).
3. *Boström :* Ziegl. Beitr. path. Anat. 9. 1 (1891).
4. *Brion, Goret* u. *Joubert :* VI. Congr. Intern. Pathol. Comp. Madrid, 4—11 Mai (1952).
5. *Brumpt :* Précis de Parasitologie. 1. édit. Paris (1910).
6. *Coppen—Jones :* Zbl. Bakt. I. Abt. **20**, 393 (1896).
7. *Ders. :* Zbl. Bakt. I. Abt. 17. 1 u. 70 (1895).
8. *Dahmen :* Lehrbuch der Veterinär-Mikrobiologie. 4. Aufl. Berlin (1949).
9. *Dresel :* Dtsch. Med. Wschr. **40—42**, 1862 (1914).
10. *Ders :* Zbl. Bakt. I. Orig. **95**, 412 (1925).
11. *Erikson :* Med. Research Council Spec. Rep. Series Nr. 240. London (1940).
12. *Fortner :* Zbl. Bakt. I. Orig. **115**, 96 (1930).
13. *Gins* u. *Paasch :* Zbl. Bakt. I. Orig. **145**, 402 (1940).
14. *Glage :* Ztschr. Fleisch u. Mlchhyg. **13**, I 166 (1902).
15. *Habs :* Bakt. Taschenbuch. 34. Aufl. Leipzig (1948).
16. *Haupt* und *Zeki :* Zbl. Bakt. I. Orig. **130** 91 (1933—34).
17. *Hülphers :* Ref. Berl. Tieräztl. Wschr. 548 (1920).
18. *Israel, O. :* Ref. Berl. Klin. Wschr. **29.** 15 (1892).
19. *Joannidès :* Ann. Inst. Pasteur **58**, 592 (1937).
20. *Klimmer :* Berl. Tierärztl. Wschr. 145 (1934).
21. *Koljakow :* Veterinär-Mikrobiologie. Moskau (1952) russ.
22. *Kolle* u. *Hetsch :* Experimentelle Bakteriologie u. Infektionskrankheiten. 10. Auf. Berlin (1952).
23. *Krassilnikow :* Systematik der Bakterien u. Aktinomyzeten. Moskau (Leningrad) (1949) russ.
24. *Lehmann* u. *Neumann :* Bakteriologische Diagnostik. 7. Aufl. München (1927).
25. *Lentze :* Zbl. Bakt. I. Orig. **141**, 21 (1938).
26. *Lieske :* Morphologie u. Biologie der Strahlenpilze (Aktinomyzeten). Leipzig (1921).
27. *Ders. :* In »Kolle—Wassermann« : Handbuch der path. Mikroorganismen. V, 1. (1928) 17.

28. *Lignières* u. *Spitz :* Ref. v. Bongert, Ztschr. Fleisch u. Milchhyg. XIII 282 (1903).
29. *Dieselben :* Zbl. Bakt. I. Orig. **35**, 453 (1904).
30. *Linhard :* Ann. Inst. Pasteur. **76**, 478 (1949).
31. *Mackie* u. *McCartney :* Handbook of Practical Bacteriology. Edinburgh (1945).
32. *Magnus :* Ref. Zbl. Bakt. I. Ref. **148**, 563 (1951).
33. *Magnusson :* Acta path. et microbiol. scand. **5**, 170 (1928).
34. *Magrou :* Ann. Inst. Pasteur. **33** 344 (1919).
35. *Manninger :* Állatorvosi bakteriológia, immunitástan és általános járványtan. Budapest (1950).
36. *Manninger* és *Bakos :* Állatorv. Lap. **8** (1937).
37. *Naelsund :* Acta path. et microbiol. scand. Suppl. VI. Kopenhagen (1931).
38. *Neuber :* Wien. Klin. Wschr. **45**, I. 357 (1932).
39. *Ders. :* Wien. Klin. Wschr. **47**, I. 708 (1934).
40. *Reskov :* Investigations into Morphology of Ray Fungi. Kopenhagen (1923).
41. *Radtke :* Berl. Tierärztl. Wschr. **50**, 797 (1935).
42. *Sásdy :* Vizsgálatok a Bacillus pyogenes tulajdonságairól. Diss. Budapest (1937).
43. *Schlegel :* in »Kolle-Wassermann« : Handbuch der path. Mikroorganismen. II 861 (1903).
44. *Steck :* Zbl. Bakt. I. Orig. **124**. 227 (1932).
45. *Szent Iványi, T. :* Acta Vet. Acad. Hung. Tom. II. Fasc. 1—2 109 (1952).
46. *Topley* u. *Wilson :* The Principles of Bacteriology and Immunity. 3. edit. London (1948).
47. *Vawter :* J. Am. Vet.-med. Ass. **109**, 198 (1946).
48. *Waksman :* The Actinomycetes. Mass. USA (1950).
49. Orig.-Ber. Berl. med. Gesellsch., Dtsch. med. Wschr. 208 (1894).
50. *Wolff* u. *Israel :* Virch. Arch. **126**, 11 (1891).
51. *Wolff* u. *Israel :* Virch. Arch., **151**, 471 (1898).
52. *Wright :* The Biology of the Microorganism of Actinomycosis. Publ. Mass. Gen. Hosp. I, 1, Boston (1905).
53. *Grooten*, Ann. Inst. Pasteur. **53**, 311 (1932).
54. *Kelser* und *Schoening :* Manual of Veterinary Bacteriology. 4. edit. Baltimore (1943) 50.
55. *Pinoy :* Bull. Inst. Pasteur. **21**—**22**, 929 u. 977 (1913).
56. *Bujwid :* Zbl. Bakt. **6**, 630 (1889).
57. *Rullmann :* Zbl. Bakt. I. Orig. **79**, 383 (1917).
58. *Kämpe :* Ref. Zbl. Bakt. I. Ref. **147** ,433 (1943).

ВОЗБУДИТЕЛИ АКТИНОМИКОЗА КОСТЕЙ РОГАТОГО СКОТА

Л. Хуссел

Р е з ю м е

Автор в связи с 15 случаями тщательно исследовал возбудителя болезни (Actinomyces bovis). Для выращивания упомянутого возбудителя найболее подходящим является анаэробный метод Фортнера. Этот возбудитель лучше всего выращивается на кровяных или на сывороточных средах. При непосредственном посеве на 2—3. день появляются первые колонии круглой формы, не выпускающие отростков и состоящие из окрашивающихся по Граму палочек, слегка набухших с одного конца. В исключительных случаях можно заметить образование истинных разветвлений и коротких нитей — подобно некоторым коринебактериям.

После повторного пересева бактерии более или менее развиваются и в присутствии кислорода, но при таких условиях постепенно снижается их прирост, и бактерии принимают коккоидную форму. Пассажем через яйца можно ускорить появление устойчивость бактерии к кислороду. Все штаммы в той или иной степени были способны к растворению красных кровяных телец человека, лошадей и овец, но сильного (β-) гемолиза не вызывали. В кислородной среде гемолиз не возникал. При анаэробных условиях однако выявлялось и протеолитическое действие ввиду того, что микроорганизмы растворяли сгущенную кровяную сыворотку овец.

Все штаммы,— образуя кислоту,— расщепляли гликозу, лактозу и сахарозу, в некоторой степени мальтозу и фруктозу, но не действовали на маннит и дульцит. С серологической точки зрения разницы между оттельными штаммами не было. За неимением достаточного исследовательского материала не было возможности определить, тождествен-ли

выделенный от рогатого скота возбудитель со штаммами, вызывающими актиномико у человека.

Автор вещественными доказательствами подтверждает, что находимые в гное актиномиком друзы являются непосредственными продуктами возбудителей. Результаты опытов дают основание сделать вывод, что Actinomyces bovis принадлежит к истинным бактериям, наиболее близок к коринебактериям, но ни в каком случае не может быть отнесен к отряду Actinomycetales и к семейству Actinomycetaceae, так как принадлежащие к этим микроорганизмы образуют истинный мицелий, из гифов которого — путем их распадения — появляются короткие формы. Иначе обстоит дело в отношении Actinomyces bovis. По мнению автора, несмотря на вышеуказанное, описанный микроорганизм — по правам первенства — и в дальнейшем должен сохранить название Actinomyces bovis. Для этого — по его мнению — тем более имеется возможность, как неболезнетворные аэробные виды микроорганизмов, ранее причисленные к роду Actinomyces, в настоящее время все чаще относят к роду Streptomyces.

ON THE CYCLIC MULTIPLICATION OF THE AUJESZKY'S DISEASE VIRUS

By
E. ÁBRAHÁM, A. KOCH and G. IVÁNOVICS

Institute of Microbiology, University Medical School, Szeged

Received October 1, 1953

Investigations concerned with the propagation of the virus of Aujeszky's disease (in the following Ay-virus) have been in progress at the above Institute for the past few years. The work has been greatly furthered by the finding that the cytopathogenic property of the Ay-virus could be employed for estimating its activity [1]. It has been observed namely that when pieces of a chick embryo's heart are exposed for various lengths of time to material bearing Ay-virus and then embedded in chicken plasma, as an hanging drop tissue culture, the explantates either do not grow at all, or when infection was slight the fibroblasts growing out of the tissue particles disintegrate gradually in consequence of viral action. This phenomenon was found to be well suited for the quantitative evaluation of the cytopathogenic effect of the virus, since under suitable conditions the error of the method does not exceed one exponential magnitude [2]. It has been established in addition that a suspension of the minced tissues of 13-day-old or older chick embryos is an excellent medium for the propagation of the Ay-virus [1]. On the other hand, post-embryonal hen tissue is not suitable for this purpose [3].

In the suspension of finely minced, mixed embryonal tissue Ay-virus begins to multiply in about 14 to 16 hours. From then on the quantity of virus rapidly increases, so, that in the 24th to 36th hour the virus content of the culture reaches its maximum. After this time the amount of virus in the culture shows a gradual decrease [2]. In such cultures the mouse- and cytopathogenic titres of the Ay-virus material run a nearly parallel course [1, 3].

In the present series of experiments a tissue culture more homogeneous than the mixed chicken embryo tissue, the excised chorio-allantoic membrane of the chick embryo, was used. Grown in this medium, the Ay-virus showed a characteristic and unusual course of multiplication that could be considered to be direct proof of the existence of a cyclic type of growth of this virus. It has been also observed that along with multiplication, in certain phases of propagation the Ay-virus undergoes qualitative changes too.

Materials and methods

Virus material. The strain of virus employed in the present experiments originated from a sick hog and was maintained in a mixed, minced embryonal chicken tissue culture, transfers having been carried out every three days [1]. Viral material from 72 hour tissue cultures was used in each series. As to technical details an earlier report by the present authors should be consulted [1,2]. The culture, 4 ml in volume and containing approximately 200 mg of tissue, was homogenized in a mortar, centrifuged gently and the extract so obtained was used for infecting the excised chorio-allantoic membranes.

Titration of virus. A detailed account of the procedures involved in the evaluation of cytopathogenic effect has been given in earlier reports [1, 2]. The chorio-allantoic membrane cultures were centrifuged, the supernatant was titrated directly and the virus enclosed in the tissue particles was assayed after extraction. Prior to extraction, the pieces of membrane were thoroughly rinsed several times with saline, then homogenized with Simms X_6 solution 1 to 10 in a mortar. The homogenizate was then sedimented by means of low-speed centrifugation. In a number of instances the amount of virus contained in the whole culture was determined. In such cases the tissue was homogenized in its culture fluid and the virus-bearing extract prepared in the above manner.

Small pieces of the heart of 13 to 15 day old chick embryos were used for estimating the cytopathogenic effect of different dilutions ($10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$, etc). To each dilution several pieces of finely minced chick heart were added, incubated for 72 hours, and then 4 to 6 of the heart fragments explanted. The highest dilution causing the destruction of, or characteristic lesions in, at least the half of the explantates was considered as the titre. The amount of virus present in the 200 mg tissue suspension, or in the nutrient fluid of the culture, was calculated on basis of the titre. The amount of virus was expressed in terms of arbitrary cytopathogenic units (CU), previously proposed by the present authors. As to the calculations involved an earlier paper should be consulted [2].

Infectivity for mice was determined by inoculating extracts intracerebrally. With material from each dilution 6 mice of 16 to 25 g weight were inoculated. The volume of a single inoculum was 0,03 ml. Animals lost within 48 hours were excluded from the experiments. The animals were kept under observation for a period of 14 days. During this time the mice showed various nervous symptoms, which, however, were mostly nonspecific. The so-called scratching symptom otherwise so characteristic of Ay-virus infection was only infrequently observable in mice infected with virus grown in chick embryo tissue culture. The absence of this characteristic symptom rendered it difficult to establish the cause of death in some cases. In view of this difficulty, each succumbed animal was dissected and the brain was subjected to bacteriological studies. Only in the case of a negative bacteriological finding was the death of the animal attributed to viral infection. With material taken from the brain of mice that had died without characteristic clinical symptoms and in which bacteriology yielded negative results another two mice were inoculated to establish the cause of death. The value of DL_{50} was calculated according to *Reed* and *Muench* [4].

Preparation of chorio-allantoic cultures. Hen eggs kept in an incubator for 13 to 15 days were opened under aseptic conditions and, when possible, the chorio-allantoic membrane was isolated in one piece. The chorio-allantoic membranes were then repeatedly rinsed with sterile, buffered saline, then spread in saline and, according to their stage of development, cut with sharp scissors into 3 or 4 parts each. The weight of such pieces of membrane varied between 200 and 250 mg. For the sake of simplicity, they were always considered to weigh 200 mg. Twelve such pieces of chorio-allantoic membrane were placed in a Petri dish. Forty-five ml of SU propagation fluid consisting of 3 parts of Simms X_1 solution, 1 part of cattle serum ultrafiltrate containing 5 U of streptomycin and 5 U of penicillin per ml were added, then 5 ml of the virus material was pipetted in. The degree of infection of the pieces of excised chorio-allantoic membrane was expressed in terms of cytopathogenic units (CU) per 4 ml culture fluid. After this, the Petri dishes were kept in an incubator at 37°C for 1 hour, then the pieces of membrane infected with virus were washed with 40 to 50 ml of buffered saline. The washing was repeated twice, in order to remove all viral material attached to the membrane surface. Following this, the pieces of membrane were placed individually in Erlenmeyer flasks of 100 ml volume each. Four ml of the SU medium were measured into each Erlenmeyer flask. By this method large numbers of virus-infected chorio-allantoic membrane cultures were obtained. At short intervals of incubation 3 of the cultures were pooled and the amount of virus contained determined.

In a few cases the excised chorio-allantoic membrane was not left in one piece but was carefully minced with scissors and a suspension of about 200 mg of the minced membrane served as medium for virus cultivation. Otherwise the procedure was similar to the one described above.

Immune serum. Virus material inactivated by means of ultraviolet irradiation was serially inoculated into rabbits. The neutralization index of the immune sera so obtained amounted to several thousand [5].

Experimental

Multiplication of Ay-virus in single pieces of excised chorio-allantoic membrane

The amount of virus present in the excised chorio-allantoic membranes exposed to virus and then washed showed wide variations at different points of time,

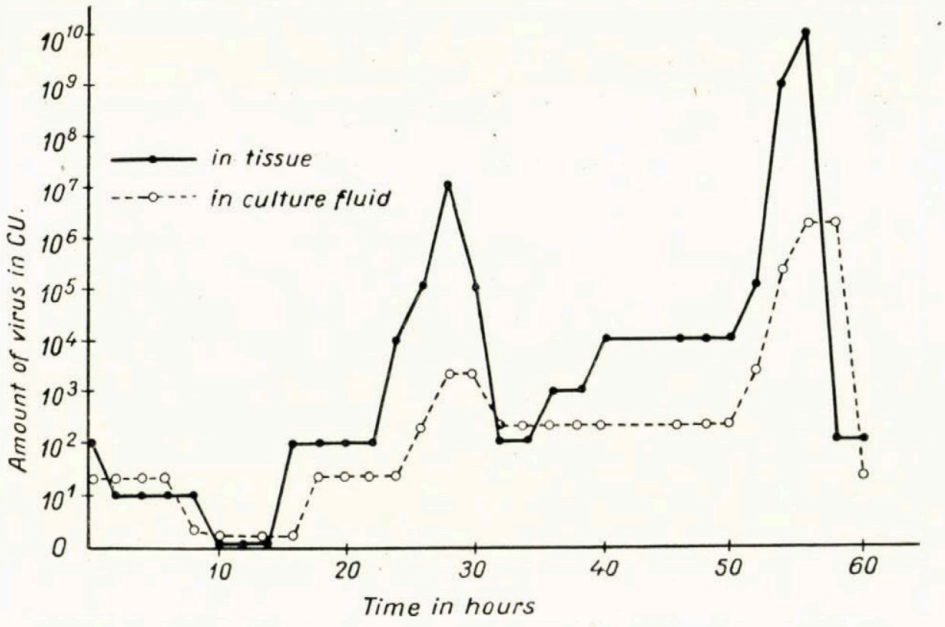


Fig. 1 The propagation of Ay-virus in cultures of chorio-allantoic membrane

as determined on basis of the cytopathogenic effect. An experiment of this type is shown in Fig. 1. In this experiment the course of viral multiplication was estimated at intervals of two hours, determining the actual amount of virus present both in the tissue particle and in the culture fluid.

It can be seen that at the beginning of the experiment the cultures of the washed membranes contained only very small amounts of virus and even that disappeared in the 10th hour of incubation. The moderate increase in the amount of virus observable after 14 to 16 hours was followed by a very rapid multiplication, beginning at the 22nd hour and reaching its peak in the 28th hour. After this, a most unusual phenomenon occurred, i. e. the cytopathogenicity of the cultures decreased with striking rapidity and its value dropped with 5 exponents within 4 hours. This phase was then followed by a gradual, moderate increase

in the quantity of virus and from the 50th hour on the cytopathogenicity of the cultures began to rise rapidly, reaching a new peak in the 56th hour. During the next two hours, however, the virus practically disappeared from the cultures, so that by the end of this phase only 1/100 000 000th part of the largest amount found could be detected.

In the experiment illustrated in Fig. 2. the changes in the cytopathogenic effect of the cultures were followed up for a period of 130 hours. Owing to technical difficulties, virus titrations were carried out in this instance at longer inervals.

This experiment yielded results agreeing with those described abotve. The first two cycles took place quite regularly in intervals of 28 hours. Particularly

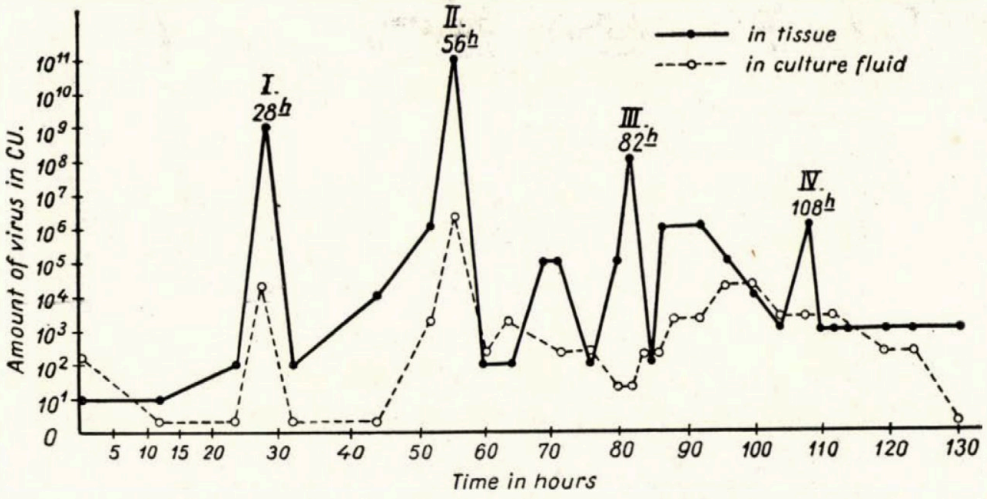


Fig. 2. The propagation of Ay-virus in cultures of chorio-allantoic membrane

striking was the drop in the cytopathogenic effect following the 56th hour. The peaks denoted III and IV on the graph occured in the 28th and 108th hours, respectively. The time elapsed between these two peaks was 26 hours, i. e. slightly less than that between the former two maximums. Another unusual feature of this experiment was that during this second stage two new waves occurred, with peaks presumably in the 70th and 89th hours.

The cyclic changes in the cytopathogenic effect of virus grown on infected and washed chorio-allantoic membranes were uniformly observable in a significant number of experiments. In some cases the changes in cytopathogenicity were not so marked as in the two experiments described, but even then there occurred a drop in the titre after the 28th hour. These experiments were evaluated only at certain points of time, as deemed necessary by experience obtained in previous observations. A total of 13 experiments of this type was made. Their results are summarized in Table I. In some of these experiments the virus content

TABLE I

Amounts of virus in cultures of chorio-allantoic membrane at different points of time, expressed in terms of cytopathogenic units

Protocol No.	5,9		5,29		5,50		5,58	5,95	5,121	5,109	5,1	6,11	5,85	6,24	6,32		Geometrical mean. (T)
Number of passages of virus	97.		114.		123.		135.	44.	55.	51.	92.	82.	40.	93.	104.		
Infective dose*	2.10^4		5.10^4		2.10^6		2.10^4	2.10^3	2.10^4	2.10^4	2.10^3	2.10^6	2.10^5	2.10^5	2.10^4	2.10^3	
Part of culture	F	M	F	M	F	M	T	T	T	T	M**	T	T	T	T	T	
Duration of cultivation 12h	2	<10	2		<2	10	2	2	20	2	10	2.10^2	20	2.10^3	2.10^3	20	$10^{1.32}$
16h	2	10^2															
20h	20	10^2															
22h	20	10^2			2	10^2	2.10^3	2.10^2	2.10^3	<20	10^2	2.10^5	20	2.10^3	2.10^5	2.10^3	$10^{2.89}$
24h			2	10^2							10^2						
26h	20	10^5									10^4						
28h	2.10^3	10^7	>2.10^4	10^9	>2.10^5	10^9	2.10^9	2.10^5	2.10^7	2.10^6		2.10^9	2.10^7	2.10^7	2.10^7	2.10^5	$10^{7.31}$
30h	2.10^3	10^5									10						
32h	2.10^2	10^2	2	10^2				<20					2.10^2				
34h	2.10^2	10^2			2.10^2	10^3	<20		2.10^3	<2	10	2.10^6		2.10^4	2.10^4	2.10^5	$10^{3.26}$
38h	2.10^2	10^3						2.10^2		2			2.10^2				
40h														2.10^5	2.10^6	2.10^5	

* The amount of virus added to the tissue culture (expressed in CU) before washing.

** Only the values for the extracts of washed membrane are shown. The virus content of the culture fluid varied between 0 and 20 CU during the whole experimental period.

F = culture fluid
M = chorio-allantoic membrane
T = whole culture (total)

of the culture fluid (F) and that of the chorio-allantoic membrane (M) were determined separately. In most instances, however, the quantity of virus in the whole culture (total T) is given. For points of time at which at least five experiments had been carried out, the geometrical mean of the results is given. In cases where the quantity of virus was determined separately in the culture fluid and in the tissues, the two values were added and their sum was used for calculating the mean value. Where attempts to determine the titre had failed, and so only the highest ($>$) or lowest ($<$) values of the experiment were available, these were used in the calculations. The calculation of the geometric mean was based on the logarithmic value of the results.

There is not much to be added to what has been stated above in connection with Table I. Apart from a single series (No. 6,32), in which the membranes were infected with 2.10^2 CU of virus, the cyclic multiplication with a peak at 28 hours was a regular occurrence in every case. Parallel with the series showing such an unusual behaviour, another series performed with an infective dose of 2.10^4 CU virus per 4 ml was also carried out and the results obtained were in accordance with the anticipations. In experiment No. 6,32, 2.10^5 CU of virus were demonstrable in the 28th hour and this value did not show any reduction during subsequent course of the experiment. It is, however, to be noted that, for unknown reasons, no definite limiting value was obtained in the 28-hour titration. Thus, the possibility cannot be excluded that the unusual result obtained in series No. 6,32 was due to some technical or experimental error.

Multiplication of Ay-virus in whole pieces of excised chorio-allantoic membrane not washed following infection

In the foregoing experiments the excised chorio-allantoic membranes were exposed to virus for 1 hour, after which time the excess of virus was removed by washing, and the membranes so treated were cultured. In the experiments to be described in the following, the single pieces of membrane were immediately placed in Erlenmeyer flasks containing 4 ml of SU fluid and after adding the proper amount of virus, the flasks were placed directly into an incubator.

At intervals 3 cultures were pooled, homogenized in a mortar and the virus present was titrated. The first determination was carried out immediately after making the culture in order to obtain in this way information on the amount of virus used for infection. In Table II the results of three experiments carried out at different times are shown.

It can be noticed that in the experiments carried out under such conditions the changes in the cytopathogenic effect of the cultures were not of the same order of magnitude in every instance. In experiment 5,116, in which only a very small quantity of virus had been used for infection, the cyclic character of viral multiplication was striking. In cultures infected with somewhat larger doses of virus

Table II

Course of Ay-virus multiplication in cultures of infected and unwashed chorio-allantoic membrane

	Protocol No.	5,116	5,129	5,85
	Number of passages of virus	51.	55.	40.
Duration of cultivation	0h	2.10^2	2.10^3	2.10^3
	12h	<2.10	2.10^2	2.10^3
	16h	2.10		
	20h	2.10^3		
	22h			2.10^2
	24h	2.10^4	$>2.10^5$	
	28h	$>2.10^5$	2.10^6	2.10^3
	30h	2.10^5		
	32h	2.10		
	34h	2.10		2.10^5
	36h		2.10^5	
	38h		2.10^4	

Note : The figures are expressing in CU-s the total amount of virus found in the culture

(such as 2000 CU) the changes in cytopathogenic effect did not follow the usual pattern ; the titre attained after 28 to 32 hours showed subsequently no marked change. The typical course failed to occur also in experiment No 5,85.

Pattern of viral multiplication in cultures of finely minced chorio-allantoic membrane

In this series suspensions of finely minced chorio-allantoic membranes were used. The tissue suspensions were exposed to the virus and washed by centrifugation. The infected and three times washed tissue was suspended in SU culture fluid. In one of the series the membrane suspension was directly infected, i. e. exposure to virus was not followed by washing. The results are shown in Fig. 3.

As regards the variations in cytopathogenicity in time, no unequivocal evidence was obtained in this series. In each of the 3 experiments (Nos. 6,7; 6,21; 5,148*)* in which washed membrane suspensions were used, the virus multiplied according to the cyclical pattern. In two of these 3 experiments (Nos. 5,148 and 6,21*)* the titre showed a marked diminution after 28 hours, while in the third case a reduction by only two exponents occurred. Nevertheless, none of the viral multiplication curves was so steep in these cases as were the curves in the series performed with non-minced chorio-allantoic membranes.

In the cultures of membrane suspension infected by adding the virus directly into the cultivating vessel (No. 5,133*)*, the reduction in the quantity of virus in the 36th hour was within the limits of error of estimation.

Estimation of the adsorptive capacity of excised chorio-allantoic membranes

In this series the virus-adsorbing capacity of the membranes exposed to virus was examined. Membranes obtained by the usual method (weighing approximately 200 mg each) were placed in 4 ml virus-bearing SU culture fluid. At the beginning of the experiment and subsequently in every other hour samples of 0.1 ml volume each were taken from the fluid of the tissue culture and titrated for cytopathogenic effect. Parallel with this experiment, cultures were

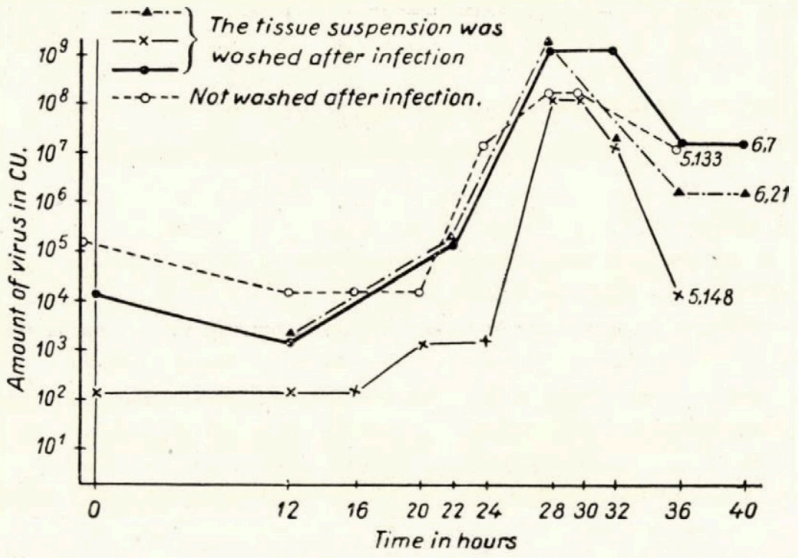


Fig. 3. The propagation of Ay-virus in cultures of finely minced chorio-allantoic membrane

made of mixed, finely minced tissues from a 13 day old chick embryo (approximately 200 mg of tissue) and these were infected in the same way. A viral suspension added to the culture fluid not containing tissue served as control for checking a possible thermoinactivation of the virus ; in accordance with earlier experience [2], thermoinactivation might be expected to occur after an experimental period of 8 hours or longer. On four different occasions 3 parallel experiments each were carried out ; the geometrical means of their results are shown in Table III.

It may be seen from Table III, that a considerable quantity of the virus disappears within a short time from the culture containing a piece of chorio-allantoic membrane. As shown by the geometrical means, by the end of the 6th hour only 200 CU of virus have remained of the initial 112 600 units, i. e. the nutrient fluid at that time contained only about 0,2 per cent of the total amount of virus originally added. On the other hand, in the nutrient fluid of the culture contain-

TABLE III

Adsorption onto chick embryo tissues of Ay-virus passaged in mixed chick embryo tissues

Time of sampling	CU per 2 ml of culture fluid														
	131. pass.			135. pass.			42. pass.			44. pass.			Geometrical mean		
	A	V	K	A	V	K	A	V	K	A	V	K	A	V	K
0h	10^5			10^6			10^4			10^4			$10^{4.7}$		
2h	10^4	10^4	10^4	10^6	10^6		10^4	10^4	10^4	10^4	10^4	10^4	$10^{4.5}$	$10^{4.5}$	10^4
4h	10^2	10^4	10^4	10^5	10^6		10^4	10^4	10^4	10^1	10^4	10^4	10^3	$10^{4.5}$	10^4
6h	10^2	10^4	10^4	10^3	10^6		10^1	10^4	10^4	10^2	10^4	10^4	10^2	$10^{4.5}$	10^4
8h	10^1	10^4	10^4	10^3	10^2	10^2	<10	10^4	10^4	10^2	10^4	10^4	$10^{1.5}$	$10^{3.5}$	$10^{3,5}$

Explanations of signs: A, culture containing chorio-allantoic membrane.
V, culture containing mixed embryonal tissues.
K, control, culture fluid containing no tissue.

ing mixed embryonal tissues the amount of virus underwent no major change. Neither did the titre of virus decrease noticeably in the control vessels. By the end of the 8th hour the virus titre of the fluid in the flask containing chorio-allantoic membranes showed a further reduction, but at that time the amount of virus was somewhat diminished both in the mixed-tissue and in the control vessels. This latter reduction in the titre is attributed to an inactivation of virus due to thermal effect.

Evidence has thus been obtained that most of the virus added to excised chorio-allantoic membranes became adsorbed. In order to elucidate the relation to time of virus adsorption and that of membrane infection, the following experiment was carried out.

Chorio-allantoic membranes obtained by the usual method were placed into 4 ml of a SU fluid containing 500 CU of virus. After incubating at 37°C for 1 hour, the membranes were removed, washed three times in saline and placed one by one into Erlenmeyer flasks containing 4 ml of nutrient fluid each. 2, 4, 6, 8 and 10 hours after the beginning of the incubation known amounts of serum from rabbits immunized against Ay-virus were added and the tissue cultures were further incubated. After 28 hours the membranes were removed from the nutrient fluid, washed repeatedly with saline, homogenized in saline at a ratio of 1 to 10, and the cytopathogenic effect of the extracts was tested. It was found that none of the membranes incubated without immune serum for periods of six hours or less contained demonstrable amounts of virus. When, however, the immune serum was added in the 8th or 10th hour of cultivation, the amount of virus in the membranes was 100 CU and 1000 CU, respectively. In the control experiment carried out without immune serum, 10^5 CU of virus were demonstrable. This suggests that although the Ay-virus becomes gradually adsorbed onto the chorio-allantoic membrane, it does not penetrate into the cells immediately.

Owing to this delayed penetration, larger amounts of virus should be kept in contact with membranes for periods of several hours for infecting a considerable number of cells.

Studies on the pathogenicity for mice of Ay-virus grown in cultures of chorio-allantoic membrane

In addition to titrating the pathogenic effect on cells of Ay-virus from membrane cultures, the mouse-infectivity titres were also estimated, by means of intracerebral inoculation. The results of four such experiments are shown in Table IV.

TABLE IV

Cytopathogenic (CP) and mouse-pathogenic (MP) titres of chorio-allantoic membrane cultures infected with Ay-virus and washed

Age of chorio-allantoic culture	Serial No. of experiment and viral material involved							
	5,50 123. pass.		5,58 135. pass.		6,11 82. pass.		6,24 93. pass.	
	CP	MP	CP	MP	CP	MP	CP	MP
16 hours	10^{-1}	$10^{-1.3}$	10^{-0}	$10^{-0.5}$	10^{-2}	10^{-1}	10^{-3}	$10^{-2.5}$
22 hours	10^{-2}	$10^{-2.6}$	10^{-3}	$10^{-1.5}$	10^{-5}	$10^{-3.3}$	10^{-3}	$10^{-3.5}$
28 hours	10^{-9}	$10^{-3.8}$	10^{-9}	$10^{-3.3}$	10^{-9}	$10^{-4.3}$	10^{-7}	$10^{-4.5}$
34 hours	10^{-3}	$10^{-2.8}$	10^{-1}	$10^{-2.6}$	10^{-6}	$10^{-5.4}$	10^{-4}	$10^{-4.5}$
40 hours							10^{-5}	$10^{-4.6}$

All four experiments uniformly indicated that during the single phases of propagation of the virus, the cytopathogenicity and mouse-pathogenicity titres of the cultures were different. Both titres increased for 28 hours, but after this period a marked decrease occurred in the cytopathogenic effect, while the pathogenicity for mice (MP) decreased insignificantly in two cases (see experiments 5,50 and 5,58*)* and remained unaltered in the third instance (experiment 6,11*)*. According to this, the cyclic nature of Ay-virus multiplication is not demonstrable by the mouse inoculation method, it being observable only in experiments concerned with the pathogenic action of the virus on tissue explantates. The only explanation for this striking observation is that the particles of the Ay-virus are not equivalent at different points of time of the propagation, i. e. the viral particles act differently in respect of the two effects under discussion. This problem will be dealt with later.

Discussion

The unusual feature in the experiments reported was the cyclic nature of Ay-virus multiplication in the chorio-allantoic-membrane culture. This cyclic course was demonstrable only in studies concerned with the cytopathogenic effect of the virus on chick embryo fibroblast tissue cultures, while the characteristic periodicity could not be observed in mouse pathogenicity* tests. After an initial resting period, the cytopathogenic effect of cultures reaches a sudden maximum in the 28th hour of propagation, which is followed by an average four exponential drop of the titre within 4 hours. This phenomenon was observed with striking regularity and of the 13 experiments carried out on 12 different occasions only in 1 have we failed to detect it. Parallel with this negative series, another experiment was performed with larger amounts of virus, and the cyclic nature of cytopathogenicity could be demonstrated in it. Anyway, in the negative experiment the infectivity titre could not be determined sharply and it might be assumed that this exceptional absence of periodicity was due to technical causes. It is true that in the series extending over periods of 38 to 40 hours the changes observed were different in magnitude in the single experiments and in extreme cases the characteristic drop in titre amounted to as much as 7 exponents, while in other instances it was considerably less marked.

The fluctuation of the cytopathogenic effect in the cultures occurs characteristically at regular intervals of 26 to 28 hours. In the only experiment of prolonged duration two new maximums with a 19 hour interval between them occurred in the second half of the experimental period, in addition to the 4 cycles observed at usual intervals. In this experiment it was also observed that in the late stages the cytopathogenic capacity of the culture, or, in particular, its fluctuations showed a tendency to decrease. This is, in all probability, due to a gradual decay of the chorio-allantoic membranes. In fact, histology has revealed that in pieces of membrane infected with virus and used for cultivation necrosis of an increasing extent occurs parallel with the duration of the propagation of the virus, most markedly so in the mesenchyma. In this respect our investigations are considered to be only informative in nature and for the time being no attempts are made to claim that a correlation would exist between the extent of necrosis on the one hand and the number of cycles, on the other.

The markedness of cycles is in correlation with the mode of infecting the chorio-allantoic membrane and with its anatomical integrity. According to the results, the piece of membrane kept in contact with the virus adsorbs it gradually, while the mixed chick embryo tissue, in accordance with earlier observation,

* »Cytopathogenicity« and »mouse pathogenicity« should be understood to mean the characteristic feature by which viral action was demonstrated.

shows no such action. It is, however, striking, that the virus adsorbed onto the membrane fails to enter the cells for a long time. Another evidence supporting this observation is that following propagation in nutrient fluid containing immune serum the piece of membrane freed from immune serum yielded virus only if it had been in contact with virus for an at least 8 hour long period prior to the adding of immune serum. In contrast with this, the present authors [2] and also *Sabin* [6] have found that minced, mixed tissue of both the chick embryo and the guinea pig, became very soon infected when exposed to Ay-virus. Even addition of immune serum after a short time could not prevent infection.

The nature of, and changes in, the pathogenicity of chorio-allantoic membrane cultures of Ay-virus are particularly marked when the pieces of membrane used for propagation have been exposed to the virus only for short periods and exposition has been followed by washing off the excess of virus. Injury to the anatomical integrity of the excised membrane used for Ay-virus propagation, such as mincing, exerts a marked influence on the changes in the pathogenicity of the culture. In such instances the sudden decrease in cytopathogenicity usually observed after 28 hours is considerably less marked, than otherwise.

Another interesting observation was that the characteristic changes in pathogenicity for tissue explantates are not associated with similar changes in infectivity for mice. On the basis of this observation it is assumed that at certain stages of propagation the viral particles present are not equivalent and a dissociation of virus occurs. While the amount of particles responsible for the cytopathogenic effect is subject to periodic changes, the quantity of particles pathogenic for mice reaches a certain level and then either decreases in a measure within the limits of experimental error, or may even show further increase.

On basis of the experimental evidence obtained not every detail of the observations reported here can satisfactorily be explained. According to our supposition, in consequence of infection with Ay-virus and the multiplication of virus in certain tissue elements of the chorio-allantoic membrane, a large number of particles exerting an exclusively or predominantly cytopathogenic effect are formed. This causes the infected cells of the membrane to necrose and disintegrate. Supporting this view are our earlier observations about the cell-injuring action of the Ay-virus, as well as the observation that in the excised membrane cultures necrobiotic signs increasing in extent can be detected. The propagation of virus in the membrane-tissue is followed by the increase of the free particles in the culture fluid. The amount of these free particles, however, is less than it can be expected, therefore one might suppose that when viral partiles are liberated from the necrotic cells most of them enter new susceptible cells, and lose their cytopathogenic capacity for a certain period of time. The analogon of this phenomenon is known in many of its details in connection with the multiplication of phages and influenza viruses.

There is no satisfactory evidence to decide whether particles with a cytopathogenic and mouse-pathogenic effect could be considered to be separate entities or else, they are in a close genetical correlation with each other, so that one would be the more developed form of the other. If the cytopathogenic particle would be the precursor, the provirus of the particle pathogenic for mammals, then the pathogenicity for mice could also be expected to be subject to periodic changes. Of course, it should be taken into consideration that only a very small proportion of the particles pathogenic for the cells of the chick embryo assumes properties pathogenic also for the mouse and it is also possible that the two types of particle multiply in diverse ways and there is no genetical correlation whatever between them.

SUMMARY

1. The cytopathogenic effect of Ay-virus cultures prepared from chick embryo chorio-allantoic membrane shows characteristic cyclic changes. In intervals of 28 hours the cytopathogenicity of such cultures shows a considerable increase, only to become reduced by several exponents within the next few hours.

2. The above phenomenon is particularly conspicuous under certain experimental conditions. Thus, it is important that the duration of exposure to Ay-virus should be identical in the different experiments. Also of importance is the anatomical integrity of the chorio-allantoic tissue used for propagation.

3. The chorio-allantoic membrane, unlike the mixed, minced chick embryonal tissue, is capable of adsorbing considerable amounts of Ay-virus within a period of a few hours. However, the cells of the membrane become infected only gradually.

4. The amount of Ay-virus grown in chorio-allantoic membrane cultures, as determined by the mouse infection method, is not parallel with the amount demonstrable by the cytopathogenicity test. In view of this it may be assumed that in such cultures dissociation of virus occurs and particles of different properties are formed.

LITERATURE

1. *Cserey-Pechány, E., Béládi, I.* and *Ivánovics, G.:* Acta Physiol. Hung. **2**, 229 (1951).
2. *Ivánovics, G., Koch, A.* and *Cserey-Pechány, E.:* Acta Physiol. Hung. **4**, 383 (1953).
3. *Ivánovics, G., Koch, A.* and *Ábrahám, E.:* Zbl. f. Bakt. In Press.
4. *Reed, L. J.* and *Muench, H.:* Amer. J. Hyg. **27**, 493 (1938).
5. *Béládi, I.* and *Ivánovics, G.:* Meeting of the Hungarian Society for Microbiology, Sept. 25, 1953.
6. *Sabin, A. B.:* Brit. J. Exp. Path. **16**, 84 (1935).

ЦИКЛИЧЕСКОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ ВИРУСА БОЛЕЗНИ АУЕСКОГО

Э. Абрахам, А. Кох и Дь. Иванович

Резюме

1. В цитопатогенных свойствах культур вируса Ауеского, выращенных на поверхности хориоаллантоидной оболочки куриного зародыша, происходят характерные циклические изменения. Цитопатогенная активность то повышается в значительной степени 28-часовыми периодами, то в течение часов понижается на несколько экспонентов.

2. Вышеуказанные явления ярко наблюдаются при определенных условиях. Так, например, важно, чтобы используемые для выращивания культур, хориоаллантоидные оболочки заражались путем длительного контакта с вирусом Ауеского. На упомянутое явление имеет влияние также анатомическая целость употребляемой для культивирования хориоаллантоидной ткани.

3. Хориоаллантоидная оболочка — в противоположность к смешанной размельченной ткани куриного зародыша — в течение нескольких часов связывает значительное количество вируса Ауеского, но заражение клеток оболочки происходит только постепенно.

4. Количество вирусов Ауеского, размножающихся на хориоаллантоидной ткани, — в отношении инфекционного действия на мышей — не параллельно их цитопатогенному действию. На основании этого можно предполагать, что при размножении в таких тканевых культурах происходит диссоциация вируса, и образуются частицы различных свойств.

A DOUBLE LAYERED POLYTROPIC MEDIUM IN THE DIAGNOSTICS OF ENTERIC BACTERIA

By
G. NÓGRÁDY and M. RODLER

Institute for Microbiology, Medical University, Pécs

Received October 10, 1953

In the differential diagnostics of intestinal bacteria, *Orlowsky* [1] was the first to recognize the significance of hydrogen sulphide formation. Originally he employed lead acetate, and it is from this that the usual iron agar media of broader utility have been derived [2, 3].

The importance of carbohydrates, and their fermentation types, in differentiating enteric bacteria, has led to the various differential media, of which Russel—Krumwiede—Kohn's agar is the one best known [4, 5]. Lately, urea hydrolysis has also been realised as an important differentiating diagnostic sign [6]. The idea of a culture medium that unites the basic reactions suitable for differentiation of enteric bacteria is not a new one, and a considerable number of such combined culture media is known [7, 8, 9, 10, 11, 12]. With these combinations it was endeavoured to unite ingredients indicating hydrogen sulphide formation and urea decomposition with those indicating carbohydrates fermentation. In one instance, a double layer medium was prepared in order to facilitate the detection of fermentation processes [13]. The greatest drawback of these media is that the acid products forming in the course of carbohydrate decomposition inhibit the early formation of hydrogen sulphide, and thereby diminish the practical usefulness of the media.

With a view to replacing Russel, Krumwiede and Kohn's agar, which indicates only the basic fermentations, it has been attempted to develop a polytropic differentiating medium which would combine the advantages of the hitherto known media of such kind. Our leading purpose was that the most important pathogenic and apathogenic enteric bacteria could be differentiated ; first and foremost those involving difficulties in the differential diagnosis. The following conditions were laid down. The hydrogen sulphide producing capacity of S. typhosa, which is known to be a very low process, should show not later than within 12 to 15 hours. The culture medium should sensitively indicate acid and gas formation and alkali production, and should permit these processes to develop simultaneously, without interfering with each other. Such a culture medium would present the practical advantage of rendering general orientation possible

by one inoculation which, with the employement of Russel's agar, has so far always called for further fermentation tests.

In our experiments 230 different combinations were tested. The medium ultimately selected as the most satisfactory shows the following essential properties. It is being poured in two layers : the bottom layer, which indicates the formation of H_2S, is overpoured by a half-high, half slanted toplayer indicating acid, gas and alkali production. In this combination fermentations do not interfere with each other, and can be assayed separately.

Technically the main feature of the proposed combination is that the conservable basic media need simply the admixture of a few ingredients to make the medium ready for use.

Preparation of basic media

Base I. 13 g of shredded agar are dissolved by boiling or autoclaving in 750 ml of water, then 20 g of Bacto peptone are added, the solution adjusted to pH 7,0, boiled ten minutes, and filtered through cotton wool. The liquid is filled up to 1000 ml, distributed into smaller quantities (200 to 400 ml), and autoclaved. At room temperature or in a refrigerator it can be stored indefinitely. Its colour is yellow, translucent, and slightly opalescent.

Base II. 13 g of shredded agar, 5,0 g of peptone »Richter«* (0,5 per cent), or 0,1—0,2 per cent Bacto peptone, and 5,0 g of potassium dihydrophosphate (0,5 per cent) are dissolved in 900 ml of distilled water with heating, the pH is adjusted to 7,5, and after boiling for 10 minutes the mixture is filtered through cotton wool. Larger quantities may be subjected to sedimentation. Filled up, the solution is distributed, autoclaved and stored as above. It is a bright yellow colour, translucent and slightly opalescent.

When preparing the bases it has to be taken into account that of Base II approximately twice the amount of Base I. is needed.

Preparation of the polytropic medium

Medium I. To 1000 ml of melted Base I 10 ml of a 2 per cent sodium thiosulphate (0,02 per cent) and 20 ml of a freshly prepared 2 per cent ferro sulphate (0,04 per cent) solution are added, adjusted to pH 7,5, tubed in 3 ml quantities, and then autoclaved. The medium which is allowed to solidify with a high slant, is of a yellowish-brown colour, translucent and opalescent, and can be used either separately for the detection of H_2S, or as the bottom layer of the polytropic culture medium.

* Hungarian product.

Medium II. To 1000 ml of melted Base II 10 g of lactose (1 per cent), 1 g of saccharose (0,1 per cent), 0,5 g of dextrose (0,05 per cent), and 15 ml of bromothymol blue solution (0,003 per cent, see later) are added and adjusted to a grass-green colour (roughly pH 7,0) with normal HCl or NaOH. The solution is then autoclaved, cooled to from 60 to 70° C, and 10 ml of a 20 per cent carbamide solution (0,2 per cent), sterilized by filtering, are added under sterile conditions. This mixture is instantly poured under aseptic precautions, in 5 ml quantities on top of medium I. The tubes are slanted so that the high portion of the upper culture medium should be approximately 0,5 cm above the surface of medium I. In this position the culture medium is then allowed to solidify with a slant of about 4 to 5 cm long. Although in practice no more than one or two tubes in several hundred turn out to be contaminated, it is still advisable to perform a 24 hour sterility test. When tubing medium II, care must be taken to prevent air bubbles to remain between the two layers, for this may lead to gas formation and consequently to erroneous findings.

Preparation of bromothymol blue solution

2 ml of normal sodium hydroxyde are measured in a tube and 0,2 g of bromothymol blue are added, dissolved with shaking and heating, while the solution is gradually diluted to from 5 to 10 ml with distilled water. After cooling the fluid is decanted into a volumetric flask, 1,8 ml of N. hydrochloric acid are added and the mixture is made up to 100 ml with distilled water. At room temperature is can be stored indefinitely.

Discussion

Quantitative fluctuations of the agar-concentration are of no consequence in the lower layer, but in the top layer the given value of 1,3 per cent is only informative. The optimal concentration of every shredded agar lot has to be determined. The decisive factor is the extent of gas production, for a too hard agar influences it detrimentally ; besides, growth is better stimulated on a medium rich in water. Bacto peptone proved to be a good source of nitrogen and sulphur in medium I, while »Richter« peptone is a suitable source of nitrogen in medium II. Sodium thiosulphate is an essential ingredient of medium I. From among the substances examined, ferro sulphate is the most advantageous for indicating the presence of hydrogen sulphide. The pH of the medium is of an utmost importance. pH 7,5 in the lower layer favours the formation of H_2S, protects that layer from acidifying processes originating in the top one, yet is low enough to change only to an inconsiderable depth the colour of the indicator in the upper medium. A pH of about 7,0 in the top layer is sufficiently low to allow early formation of acid, neither does it hinder the formation of an alkaline environ-

ment. With an indicator as sensitive as bromothymol blue, a reduced amount of dextrose renders possible the observation not only of acid formation but also of alkali. Phosphate, on the one hand, serves to purify the top medium and, on the other, favours urease activity. The indicator does not inhibit growth and sensitively indicates any change in the pH. In order to avoid pyrolysis, it is essential that the carbamide be added to the medium only after this has cooled to 60 to 70°C. Carbamide serves to demonstrate urease activity. The 50 mm height of the lower part of the top layer secures semi-anaerobic conditions in the bottom layer ; at the same time, it does not sweep off much inoculum, whereby the formation of hydrogen sulphide is accelerated.

Inoculation of the medium

Inoculation is carried out with a needle slightly bent at the end. After the point had touched the colony selected, the needle is driven right through the condensed water to the bottom of the tube, then retracted, and an inoculation made in a straight line on the slanted surface. This procedure warrants the presence of an amount of inoculum sufficient to effect early H_2S-formation and a surface culture heavy enough for agglutination. It needs to be mentioned that the agglutinability of bacteria (Shigella and Salmonella groups) grown on the medium remains unchanged.

Efficiency of the medium

The different fermentation types manifest themselves with the following signs in the medium. *H_2S-formation :* the lower layer blackens. *Acid formation :* the upper high, or the high and slanted layers turn yellow. *Alkali formation :* the whole top portion or the slanted part takes a blue colour. *Urease activity :* essentially an intensive formation of alkali with the whole top layer turning bright blue. *Gas formation :* gas bubbles appear in the top layer of the medium, in some instances in the lower layer as well. *Pigment formation :* discoloration of the culture medium in comparison with the control.

On inoculating the more important enteric bacteria, the order of appearance of fermentations is the following. By their great capacity to form alkali (urease activity) beginning in the 3rd or 4th hour, members of the Proteus group are detectable. Following this, the intensive acid production by E. coli, and the moderate acid production by the other carbohydrate-splitting enteric bacteria becomes observable. H_2S-production develops between the 8th and the 10th hour and permits the definite distinction of Proteus vulgaris and the tentative differentiation of the S. typhosa and S. paratyphi group. At the 12th hour,

S. typhosa can be distinguished from the Shigella group with certainty, gas formation, and alkali production become marked (S. paratyphi, E. coli), and signs of pigment production appear. With some strains, deviations from this general description may be noticed in the time needed for the setting in of fermentation ; similarly, differences may occur within the same strains in consequence of different quantities of inoculum and of the state of growth of the inoculated bacteria. From among the less frequent types of fermentation representing a qualitative deviation, it should be mentioned that some paracolon strains alkalize the upper slanted part of medium. Occasionally one may come across a strain of E. coli that forms H_2S (E. freundii). E. coli aerogenes may be distinguished by its mucous culture.

Table I presents the fermentational qualities of the more important enteric bacteria. On the basis of the data it is believed that the polytropic medium exceeds Russel—Krumwiede—Kohn's agar in efficiency.

TABLE I

Fermentation of the more important enteric bacteria on a polytropic culture medium in the 12th hour of incubation

Strains	Bottom layer	Top layer	
	H_2S	high	slanted
Shigella	—	acid	slightly alkaline
S. typhosa	+*	acid	slightly alkaline
S. paratyphi	++**	acid, gas	slightly alkaline
E. coli	—(+)	acid, gas	acid, gas
Paracoli	—	acid, gas	acid, gas, slightly alkaline
P. vulgaris	+++	strongly alkaline	strongly alkaline
P. morgani	—	strongly alkaline	strongly alkaline
Ps. aeruginosa*	—	unchanged	unchanged

* Pigmentation.

** Blackening in cultures of S. typhosa only, along the stabbing line, in cultures of S. paratyphi much more extensive.

Table II summarizes the data of the most widely used differentiating media, including the approved combinations for indicating H_2S formation, and Christensen's agar as well. By comparison, our polytropic medium appears, in its essence, to be a combination of the simple ferro-peptonic agar, Krumwiede—Kohn's agar, Christensen's agar and Sulkin—Willett's medium, and can be used with more advantage than any of them.

TABLE II

Comparative summary of essential properties in differential culture media

Authors	Sugar, per cent			Ferrous salt	Indicator	pH	Layers	H_2S	Acid	Gas	Urease	Possible diagnose hours
	Lact.	Sacch.	Dext.									
Russel 1911 modified	1	—	0,1	—	Phenolred	7,4	—	—	+	+	—	24—48
Krumwiede, Kohn 1917	1	0,1	0,05	—	Andrade	7,4	—	—	+	+	—	24—48
Kligler 1917	1	—	0,1	$FeSO_4$	Phenolred	7,4	—	+	+	+	—	36—40
Sulkin, Willett 1940	1	1	0,1	$FeSO_4$	Br thymol blue	7,4	—	+	+	+	—	18—36
Hajna 1945	1	1	0,1	$Fe(NH_4)2(SO_4)_2$	Phenolred	7,4	—	+	+	+	—	24—36
Difco 1948	1	1	0,1	$FeSO_4$	Phenolred	7,4	—	+	+	+	—	24
Bader, Holtz 1951	1	—	0,1	$FeSO_4$	Phenolred	7,4	—	+	+	+	+	16—24
Schmid and al. 1952	1	—	0,1	$FeSO_4$	Phenolred	7,4 / 6,8	+	+	+	+	+**	36—40
Nógrády, Rodler	1	0,1	0,05	$FeSO_4$	Br thymol blue	7,0 / 7,5	+	+	+	+	+*	12—15
Orlowsky 1897 modified	—	—	—	(Pb acetate)	—	6,6	—	+	—	—	—	18—24
Levine and al. 1932	—	—	—	Ferriammon citrate	—	6,7	—	+	—	—	—	12
Christensen 1946 modified	—	—	—	—	Phenolred	6,8	—	—	—	—	+	2— 4

* = carbamid decomposition in 2—3 hours.
** = carbamid decomposition in 3—4 hours.

SUMMARY

1. Having examined 230 different combinations of media, a double-layered, high-slanted polytropic medium was prepared.

2. It was found that after incubation for from 12 to 15 hours on the medium it is possible to differentiate the most important enteric bacteria (S. dysenteriae, S. typhosa, S. paratyphi P. vulgaris, P. morgani, Ps. aeruginosa, E. coli) as well as their intermediates.

3. Use of the medium accelerates and simplifies diagnosis, and renders a great many of the agglutination and biochemical tests unnecessary.

REFERENCES

1. *Orlowsky, A. A.:* Dissert. St. Petersburg, 1897.
2. *Levine, M.:* Proc. Soc. Exp. Biol. **29**, 1022 (1932).
3. *Levine, M.:* Am. J. Publ. Health, **27**, 1240 (1937).
4. *Russel, W.:* J. Med. Research, **25**, 217 (1911).
5. *Krumwiede, C., Kohn, L. A.:* J. Med. Research, **37**, 225 (1917).
6. *Christensen, W. B.:* J. Bacteriology, **52**, 461 (1946).
7. *Kligler, J. J.:* Am. J. Publ. Health, **7**, 1042 (1917).

8. *Kligler, J. J.:* J. Exp. Med. **28**, 319 (1918).
9. *Sulkin, Willett:* J. Lab. Clin. Med. **25**, 649 (1940).
10. *Hajna, A. A.:* J. Bact. **49**, 516 (1945).
11. *Difco Manual* 1948. 121.
12. *Bader, R. E., Hotz, G.:* Zschr. f. Hygiene, **133**, 20 (1951).
13. *Schmidt, E. E., Chapman, T. E. D., Veladupillai, F.:* Zschr. f. Hygiene, **136**, 115 (1953).
14. *Difco Manual* 1948. 123.

ДВУХСЛОЙНАЯ ПОЛИТРОПНАЯ ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА В ДИАГНОСТИКЕ КИШЕЧНЫХ БАКТЕРИЙ

Дь. Ногради и М. Родлер

Резюме

На среде, изготовленной в результате исследования 230 комбинированных питательных сред, в течение 12—15 часов дифференцируются Sh. dysenteriae, S. typhosa, S. paratyphi, E. coli, P. vulgaris, P. morgani. Ps. aeruginosa, а также их переходящие типы. Данная питательная среда объединяет в себе особенности железопептонного агара и прочих дифференцирующих питательных сред, в результате чего значительно упрощается поставка диагноза. Ввиду быстро появляющихся различных биохимических дифференцирующих реакций, вышеупомянутая среда может применяться с лучшим успехом, чем описанные до сих пор, подобные ей питательные среды.

DIE WIRKUNG DIÄTISCHER EIWEISSKOMPLETTIERUNG AUF DIE ANTITOXINPRODUKTION BEI MIT TETANUS-ANATOXIN IMMUNISIERTEN KINDERN

Von
L. FEKETE

Aus dem Institut für Ernährungswissenschaft

Eingegangen am 28. Oktober 1953

Die alte epidemiologische Beobachtung, wonach gut ernährte Personen über eine grössere Widerstandsfähigkeit verfügen, wird durch die neueren ernährungswissenschaftlichen und immunbiologischen Untersuchungen auch in ihren Einzelheiten bestätigt.

Zahlreiche Wahrnehmungen beweisen, dass bei der Entwicklung der Immunität und der Aufrecherhaltung der Immunstoffbildung vor allem die Eiweissernährung eine wichtige Rolle spielt. So wiesen *Whipple* [1] und seine Mitarbeiter wiederholt nach, dass sich die Empfänglichkeit von hypoproteinämischen Hunden gegenüber Infektionen erhöht. Diese Empfänglichkeit kann durch Gabe von Eiweiss in hohem Masse verringert werden. Auch Mäuse sind für Kontaktinfektion empfänglicher, wenn wir die Milch von ihrer Diät streichen. *Cannon*, *Chase* und *Wissler* [2] beobachteten, dass wenn sie junge Kaninchen auf einer eiweissarmen Diät hielten, auf Wirkung von Impfungen mit durch Formaldehyd getöteten Typhusbakterien viel weniger Agglutinin produziert wurde als bei gut versorgten Kontrolltieren. Sie fanden weiter in Rattenuntersuchungen, dass bei auf eiweissarmer Diät gehaltenen Tieren der auf Wirkung von parenteral eingegebenen gewaschenen roten Hammelblutkörperchen erzeugte Hämolysinspiegel weit niedriger ist als bei den auf Eiweissdiät gehaltenen Kontrolltieren. *Woolridge* [3] hielt Ratten solange auf eiweissfreier Diät, bis ihr Reserveeiweiss erschöpft war, und sättigte sodann den Organismus mit Eiweiss von guter Qualität. Wenn die Eiweisssättigung vor Einführung des Antigens geschah, konnte bei der Produktion des Immunstoffes eine beträchtliche Erhöhung beobachtet werden. *Sakol* [4] teilte mit, dass wenn er junge weisse Mäuse 6 Wochen hindurch mit biologisch hochwertigen Eiweissen sättigte und sie sodann mit dem Mehrfachen der letalen Dosis des Standardpneumokokkenstammes infizierte, diese viel längere Zeit am Leben blieben, als die von einer Eiweissnahrung mit niedrigem biologischen Wert lebenden Kontrolltiere. Der unbestreitbare experimentelle Beweis für den engen Zusammenhang zwischen Eiweissernährung und Immunstoffproduktion wurde durch die mit schwerem N durchgeführten Untersuchungen von *Schoenheimer*, *Ratner* und *Rittenberg* erbracht. Sie fügten der Diät der Versuchstiere mit schwerem N

bezeichnete Aminosäuren und Ammoniak bei und stellten fest, dass der Organismus das eingeführte schwere Nitrogen zur Synthese der Plasmaproteine und zum Aufbau anderer Gewebeeiweisse verwandte. Sie wiesen ferner nach, dass auch die Immunstoffeiweisse von aktiv immunisierten Ratten und Meerschweinchen in ähnlicher Weise das gefütterte schwere Nitrogen enthalten. Die auf passive Weise eingeführten Immunstoffe nehmen hingegen am Nitrogenstoffwechsel nicht teil [6, 7[.

Selbst das neuere Schrifttum ist noch recht arm an am Menschen durchgeführten ähnlichen, genauen Ernährungs- und immunbiologischen Beobachtungen. Die diesbezüglichen zahlreichen Mitteilungen besprechen die Angaben allgemeiner epidemiologischer Untersuchungen und sich mit mangelhafter Ernährung befassenden Beobachtungen. Von Wert sind die sowjetischen Beschreibungen der Leningrader Hungersnot. *Abramowitsch* und *Münchin* [8], sowie *Rasdolski* [9] beobachteten einen Zusammenhang zwischen Ernährung und Widerstandsfähigkeit. Während des zweiten Weltkrieges fand *Kerpel-Fronius* [10] 1945 an Säuglingen, dass Pyodermie, Furunkulose und Diarrhöe bei den an milcharmer Diät lebenden weit häufiger auftraten. Die Immunstoffproduktion im Menschen wurde von *Gell* [11] 1946 an den Einwohnern der Wuppertaler Gefangenenlager untersucht. Er beobachtete die Veränderungen im Agglutinationstiter nach Eingabe von roten Vogelblutkörperchen und von Tabakmosaikvirus, und zwar bei mangelhaft und bei gut ernährten Personen. Infolge der ungeeigneten Selektion, der mangelhaften diätischen Beurteilung und der irrigen immunbiologischen Einstellung erhielt er keine eindeutig verwertbaren Zusammenhänge. Ähnlicher Ursachen wegen sind auch die Untersuchungen und Schlussfolgerungen von *Schneider* [12] und *Parry* [13] nicht vollwertig. Heute ist es bereits bekannt, dass die Ernährungsbeziehungen der sich auf Virusinfektionen entwickelnden Widerstandsfähigkeit mit den diätischen Zusammenhängen der auf Wirkung von Parasiten und Bakterien oder von Toxinantigenen auftretenden Immunstoffproduktion nicht identifiziert werden können.

Die erwähnten Beobachtungen am Menschen klärten nicht die Rolle der Ernährungsfaktoren und boten nur allgemeine Hinweise bezüglich der Bildung der natürlichen Widerstandsfähigkeit.

Andererseits bewiesen die Angaben der Tierexperimente die Rolle der Eiweissernährung vom Gesichtspunkt der Bildung einer Abwehr gegen bakterielle Infektionen, vor allem bei immunisierten Tieren. Gerade deshalb erschien die Untersuchung dessen wichtig, in welcher Weise die Wirkung der bei Kindern zu präventiven Zwecke angewandten aktiven Immunisierung mit der vor der Impfung eingeführten Ernährung mit Eiweiss von guter Qualität zusammenhängt.

Verfahren : Wir führten unsere Untersuchungen an zwölfjährigen Knaben durch, bei denen — im Sinne der diesbezüglichen Verordnung — die Tetanusschutzimpfung ohnedies vorgenommen werden musste. Mit Hilfe der Organisa-

tion der Schulärzte und Fürsorgeschwestern des Ujpester Schulärztlichen Ambulatoriums wählten wir insgesamt 60 Kinder für diese Beobachtungen aus. Bei der Auswahl achteten wir darauf, dass solche Kinder zur Beobachtung gelangten, welche ein möglichst gleiches Ernährungsniveau und gleichen Entwicklungszustand zeigten und an keiner organischen Krankheit litten. Kinder, welche eine Antitetanusschutzimpfung erhalten hatten oder in antibiotischer Behandlung standen, wurden von uns nicht berücksichtigt. Vom Ernährungsgesichtspunkt wählten wir jene Kinder aus, welche bei einer hinsichtlich des kalorischen Wertes und Gesamteiweissinhaltes genügenden Ernährung auf einer an komplettem Eiweiss armen und Pflanzeneiweiss reichen einseitigen Diät lebten.

Jedes Kind wurde von uns vor der Immunisierung und am Ende der Beobachtung mittels diätisch-sanitären Prüfungsmethoden untersucht; wir fertigten diätische Aufnahmen an und nahmen Bestimmungen des Nährstoffbedarfes vor [15]. Wir teilten die Schüler in zwei Gruppen ein: I. in eine Untersuchungs- und II. in eine Kontrollgruppe. Die 30 Kinder der Untersuchungsgruppe erhielten vor der Immunisierung vier Wochen lang — in Form eines zweiten Frühstücks — täglich soviel tierisches Eiweiss von ausgezeichneter Qualität (Milch, Käse, Eier, kalten Aufschnitt, Schinken usw.), dass ihr Bedarf dadurch gedeckt war. Die separat gegebenen Eiweisse von hohem biologischen Wert komplettierten die tägliche Kost der Kinder. Das Ausmass der Komplettierung und die Angaben des Nährstoffverbrauches sind in Tabelle I angeführt.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass der Grundverbrauch beider Gruppen hinsichtlich des Eiweisses und auch der anderen Nährstoffe annähernd gleich war.

TABELLE I

Verhältnis der Nährstoffzufuhr bei den einen Überschuss von Eiweiss verbrauchenden Kindern zum Verbrauch der Kontrollgruppe und zum Nährstoffbedarf

		Kalorien	Eiweiss in g		Fett g	Kohlenhydrate g	Vit. A I. E.	Vit. B_1 mg	Vit. B_2 mg	Nikotins. mg	Vit. C mg	Vit. D γ	Ca g	Fe mg
			total	komplett										
Eiweissgruppe	Grundverbrauch	2180	70,5	17,6	60,0	288,0	1536	0,768	0,805	15,0	28,0	7,0	0,355	14,0
	Ergänzung	643	39,6	29,9	24,8	62,8	1155	0,382	0,770	6,5	4,8	8,2	0,526	4,5
	Gesamtzufuhr	2823	110,1	47,5	84,8	350,8	2691	1,150	1,575	21,5	32,8	15,2	0,881	18,5
Bedarf der Eiweissgruppe (32 kg)		2347	87,0	39,0	78,0	322,0	3733	1,4	1,7	15,0	43,0	32,0	1,1	13,0
Kontrollgruppe		1908	71,0	17,2	55,0	281,0	1620	0,725	0,741	13,0	31,0	5,0	0,366	17,0
Bedarf der Kontrollgruppe (30 kg)		2200	82,0	37,0	73,0	302,0	3500	1,3	1,6	14,0	40,0	30,0	1,0	12,0

Infolge des Mehrverbrauches an Eiweiss überstieg das Totaleiweiss und die Zufuhr von komplettem Eiweiss den physiologischen Bedarf. Durch die Ergänzung erhöhte sich die Zufuhr an tierischem Eiweiss, bezogen auf die Totaleiweissmenge, von 24% zu Beginn auf 42%, während diese bei der Kontrollgruppe auf dem Niveau von 20—24% verblieb. Infolge des Verbrauches von eiweissreichen Nährstoffen überstieg der Verbrauch an Fett, Vitaminen und Kalzium die Bedarfsgrenze.

Nach vierwöchiger Sättigung mit Eiweiss impften wir die Kinder beider Gruppen mit 1 ml Tetanusanatoxin (Phylaxia). Die Extraernährung der Untersuchungsgruppe wurde auch nach dem Impfen fortgesetzt. In der fünften Woche nach der Injektion entnahmen wir von jedem Kind Blut und führten eine Antitoxinbestimmung durch. Wir bestimmten den Antitoxintiter auf dem Wert von L-/400 mittels der vom Landesinstitut für Gesundheitswesen übernommenen und von Erdős kontrollierten Methode. Trotz aller Sorgfalt und Achtsamkeit konnte die Antitoxintitration nur bei 28 der 30 mit Eiweiss gesättigten und nur bei 17 der Kontrollkinder vorgenommen werden.

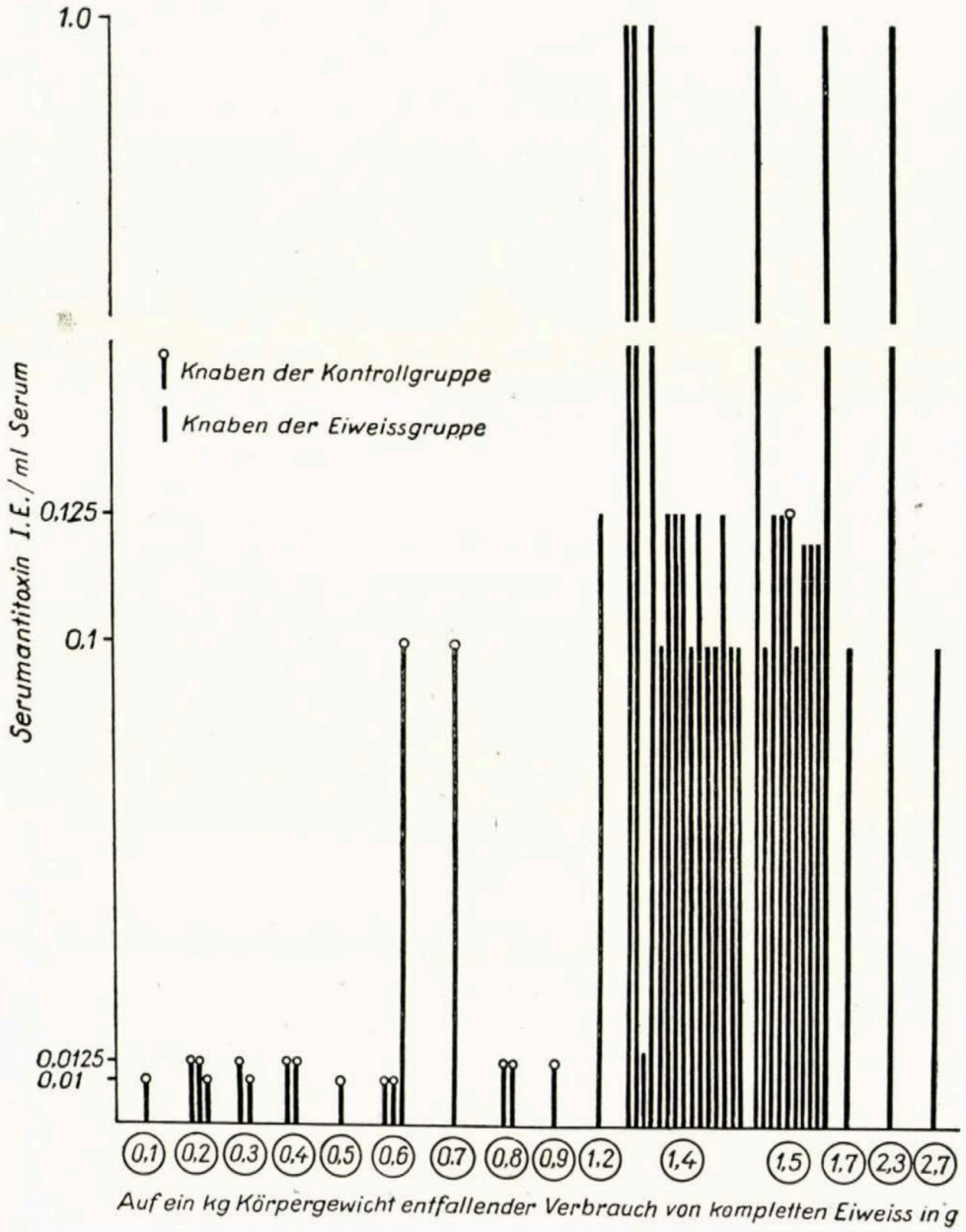
Wir müssen erwähnen, dass das Ziel unserer Untersuchungen nicht die Erreichung einer völligen Immunität, sondern die Beobachtung der immunbiologischen Antwort war. Deshalb begnügten wir uns mit der Untersuchung und Auswertung des Zustandes nach der ersten Impfung.

Ergebnisse : Wir arbeiteten statistisch die Angaben der Antitoxintitration und den auf 1 kg Körpergewicht entfallenden Verbrauch an komplettem Eiweiss auf. Blutentnahme und Bestimmung des Immunstoffes geschahen in der fünften Woche nach der Impfung.

Zur Erreichung des niedrigsten Niveaus der Immunität gegenüber Tetanus ist nach *Ramon* [16], *Boyd* [17], *Bergey* und *Etris* [18] sowie auch nach *Erdős* [19] im Falle einer aktiven Immunisierung in 1 ml Serum eine Mindestproduktion von 0,005—0,01 I. E. Antitoxin notwendig. Eine massive Immunität wird durch 0,1—1,0 I. E. enthaltende Sera gewährleistet.

Das folgende Säulendiagramm zeigt die immunbiologische Wirkung der Eiweisse von hohem Nährwert sowie die Zusammenhänge zwischen der Zufuhr an komplettem Eiweiss und der Menge des erzeugten Antitoxins. Auf der Abszisse sind die steigenden Angaben der auf 1 kg Körpergewicht entfallenden Zufuhr an komplettem Eiweiss angeführt, auf der Ordinate die wachsenden Werte der in 1 ml Serum befindlichen Immunstoffmengen. Auf beiden Achsen sind die Angaben derart aneinandergereiht, dass von 0 angefangen — am Beginn der Reihe — die niedrigsten und am Ende der Reihe die höchsten Verbrauchs- und Immunstoffwerte erscheinen. Jede Säule entspricht den Angaben eines Schülers.

Auf Grund dieses Bildes können wir die Schlussfolgerung ziehen, dass unter unseren experimentellen Umständen zwischen dem Ausmass des Verbrauches von komplettem Eiweiss und dem Quantum des produzierten Immunstoffes


1.0
0.125
0.1
0.0125
0.01
Serumantitoxin I.E./ml Serum
Knaben der Kontrollgruppe
Knaben der Eiweissgruppe
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6
0,7
0,8
0,9
1,2
1,4
1,5
1,7
2,3
2,7
Auf ein kg Körpergewicht entfallender Verbrauch von kompletten Eiweiss in g

eine Parallelität besteht. Ein höherer Verbrauch von komplettem Eiweiss entspricht einem grösseren Serumantitoxintiter.

Die Kinder der Kontrollgruppe konsumierten 0,10—0,9 g komplettes Eiweiss pro kg Körpergewicht. Dementsprechend bewegte sich ihre Immunstoffproduktion um die Werte 0,01—0,0125 I. E./ml. Zwei Kontrollkinder produzierten bei einem Eiweisszufuhrniveau von 0,6—0,7 g/kg 0,10 I. E./ml Immunstoff. Von diesen hatte der eine (R. K.) ein Jahr vor der Untersuchung passive Immunisierung gegen Tetanus erhalten, während es bei dem anderen Knaben nicht gelang, die immunbiologische Ursache dieses Hervorspringens festzustellen. Ein Schüler der Kontrollgruppe (S. Sz.) lebte während der Beobachtungen zu Hause auf einem entsprechenden Verbrauchsniveau an komplettem Eiweiss (1,54 g/kg), und seine Immunstoffproduktion betrug 0,125 I. E./ml. Die Kinder der Eiweissgruppe produzierten — entsprechend dem höheren Zufuhrniveau — sowohl durchschnittlich als auch individuell mehr Immunstoff. Bei diesen gab es eine Ausnahme (F. K.): dieser erzeugte bei einem Eiweisszufuhrniveau von 1,43 g/kg nur 0,0125 I. E./ml Immunstoff — weit weniger als die übrigen Kinder. Die klinische Untersuchung zeigte bei diesem Knaben Verdauungsstörungen und — nach Read gerechnet — einen gesteigerten Grundstoffwechsel (+36%). Auf Grund des Bildes ist noch festzustellen, dass massive Immunstoffproduktion bei einem Verbrauchsniveau an komplettem Eiweiss von 1,2—1,7 g/kg zu finden ist.

Vor allem sowjetische Verfasser — so *Tscherkess* [20] und andere — heben die Rolle der Vitamine vom Gesichtspunkt des Eiweissstoffwechsels hervor. Andere sowjetische Forscher, wie *Gostew* und *Petrjaschin* [21], betonen wiederum die Rolle der diätischen Eiweisse bei der Sicherstellung der Aufrechterhaltung der Immunstoffproduktion.

Es muss erwähnt werden, dass infolge der Gabe von eiweissreichen Nährstoffen sich auch der Verbrauch von Vitaminen und mineralischen Nährstoffen bei den Kindern der Eiweissgruppe beträchtlich erhöhte, was nach einzelnen Verfassern vom Gesichtspunkt des Wirkungsmechanismus der Immunstoffproduktion zu berücksichtigen ist. Diese Frage wurde neuerdings von *Ludovici* und *Axelrod* [22] u. a. untersucht. Sie bewiesen durch zahlreiche immunbiologische Untersuchungen, dass eine eiweissarme Diät vergebens durch Vitamine ergänzt wurde: der Immunstofftiter zeigte bei aktiv immunisierten Tieren keine Erhöhung. Eine solche trat nur dann ein, wenn die Diät mit Tryptophan oder Eiweiss von guter Qualität komplettiert wurde.

Nach unseren Diätuntersuchungen betrug der Verbrauch der Kontrollgruppe an Vitamin B_2 (0,725 mg pro Tag) gerade die Hälfte der Zufuhr der Eiweissgruppe (1,50 mg pro Tag). Zahlreiche Forscher bewiesen, dass das Vitamin B_2 vom Gesichtspunkt der Ausnützung der diätischen Eiweisse, des Aufbaus des Körpereiweisses und damit auch der Synthese des Eiweissteiles des Immunstoffes äusserst wichtig ist. Es ist noch durch weitere Untersuchungen

zu entscheiden, welche Rolle das Lactoflavin und die übrigen Glieder der B-Gruppe bei der Erzielung der mitgeteilten Ergebnisse spielten.*

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird die Wirkung einer Komplettierung durch diätisches Eiweiss von hohem Mehrwert auf die Erzeugung von Immunstoffen bei mit Tetanusanatoxin immunisierten 12jährigen Knaben beschrieben.

1. Es konnte festgestellt werden, dass auf Wirkung der vor der Impfung eingeführten und auch während der Immunisierung angewandten diätischen Eiweisskomplettierung im Blut der untersuchten Kinder mehr Immunstoff erzeugt wurde als im Serum der nicht komplettierten Kontrollschüler.

2. Es konnte nachgewiesen werden, dass unter unseren Untersuchungsumständen zwischen dem auf 1 kg Körpergewicht entfallenden Verbrauch an komplettem Eiweiss und der Menge des erzeugten Immunstoffes ein positiver Zusammenhang besteht. Zu einem höheren Verbrauch an kompletten Eiweiss gehören grössere Serumantitoxinwerte.

3. Eine massive Immunstoffproduktion konnte in der beobachteten Altersgruppe bei einem Zufuhrniveau an komplettem Eiweiss von 1,2—1,7 g/kg beobachtet werden.

4. Eine für die Praxis zu ziehende Schlussfolgerung war, dass im Laufe von Präventivimpfungen bei an einseitiger Diät und einer an pflanzlichem Eiweiss reichen Nahrung lebenden Kindern eine 2—3 Wochen vor der aktiven Immunisierung angewandte Ergänzung durch Eiweiss von guter Qualität (Eier, Milch, Käse usw.) den Erfolg der Impfungen — und damit auch den Wert der wirksamen Immunisierung — in hohen Grade zu steigern imstande ist. Unter unseren Untersuchungsumständen erfolgte nach Gabe von Eiweiss guter Qualität eine massivere Immunstoffproduktion und gewährleistete damit wahrscheinlich auch eine anhaltendere Immunität.

LITERATUR

1. *Whipple, G. H.:* J. Exp. Physiol. **25**, 363 (1945).
2. *Cannon, Chase* u. *Wissler:* J. Immunol. **47**, 133 (1943).
3. *Woolridge, R. L.:* J. Immunol. **52**, 267 (1946).
4. *Sakol, W. S.:* J. Pediat. **20**, 415. 1942.
5. *Schoenheimer, R., Ratner, S., Rittenberg, D.* u. *Heidelberger M.:* J. Biol. Chem. **144** 541 (1942 .
6. *Heidelberger, M.* u. Mitarbeiter: J. Biol. Chem. **144**, 555 (1942).
7. *Schoenheimer, R.* u. Mitarbeiter: J. Biol. Chem. **144**, 545 (1942).
8. *Абрамович, Г. Б. и Мыихин, С. С.:* Эксп. Сов. Мед. 1941—1945. 28, 117. 1951.
9. *Расловский, С. Н.:* Эксп. Сов. Мед. **28**, 113 1947—48, Медгиз, Москва.
10. *Kerpel—Fronius, E.:* J. Pediat. **30**, 244 (1947).
11. *Gell, P. G. H.:* Proc. Roy. Soc. Med. London, **41**, 324 (1948).
12. *Schneider, H. A.:* Am. J. Public Health, **39**, 57 (1949).
13. *Parry, H.:* Proc. Roy. Soc. Med. London, **41**, 324 (1948).
14. *Fekete, L.:* »Táplálkozás-egészségügyi szűrővizsgálatok technikája« Budapest, 1951, Verlag für Gesundheitswesen.
15. Nährstofftabelle. Publikation des Instituts für Ernährungswissenschaft, Budapest, 1952.
16. *Ramon, L.:* Presse. Med. **34**, 485 (1926).
17. *Boyd, J.:* The Lancet, **I**. 11, (1946).
18. *Bergey, A.* u. *Etris, C.:* J. Immunol. **31**, 363 (1936).
19. *Erdős, L.:* Honvédorvos 385 (1952), sowie auf Grund persönlicher Mitteilungen.
20. *Уеркесс, Л. А.:* Клин. Мед. **2**, 12 (1952).
21. *Гостев, В. С.* и Петряшин, М. Н.: Вопр. Питания 2. Н. 110 (1950).
22. *Ludovici, P. P.* u. *Axelrod, A. F.:* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **76**, 670 (1951).

*Ich möchte Dr. László Erdős, Abteilungsleiter des Instituts für Volksgesundheitswesen, und Chefarzt Dr. Emil Bognár, Leiter des Ujpester Schulärztlichen Ambulatoriums, sowie Frau Dr. Rózsa Kerschbaumayer — die bei der Durchführung und Auswertung der Untersuchungen behilflich waren — für ihre Mitwirkung meinen besten Dank aussprechen.

ВЛИЯНИЕ УКОМПЛЕКТОВАНИЯ СИСТЕМЫ ПИТАНИЯ БЕЛКАМИ НА ОБРАЗОВАНИЕ АНТИТОКСИНА У ДЕТЕЙ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ СТОЛБНЯЧНЫМ АНАТОКСИНОМ

Л. Фекете

Р е з ю м е

Автор описывает влияние укомплектования системы питания полноценными белками у 12-ти летних мальчиков, питавшихся преимущественно растительными белками. Можно было установить, что под влиянием укомплектования белков (мясом, сыром, творогом и т. д.), в крови подопытных учеников появлялось больше антитоксина, чем у контрольных. Максимальное образование антител определялось при потреблении полноценных белков в количестве по 1,2 – 1,7 г. на 1 кг веса.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE VERBREITUNG DER PATHOGENEN STAPHYLOKOKKEN

Von
Gy. DARÁNYI

*Institut für Sporthygiene, Budapest**

Eingegangen am 3. November 1953

Die medizinische Literatur befasst sich eingehender mit dem Nachweis der Pathogenität der Staphylokokken (St) erst seit etwa 25 Jahren. Den ersten Impuls zu diesen ausgedehnteren Untersuchungen gaben ungarische Arbeiten (*Darányi :* Cbl. f. Bakt. O. I. 99, 74—1926 ; Math. és Term.-Tud. Értes. XLIII—424—1926 ; Wien. med. Wschr., No. 5—1927), welche die Fähigkeit der St, Zitratblut zur Gerinnung zu bringen, als die einfachste und zuverlässigste Methode der Pathogenitätsprüfung beschrieben. Diese meine Ergebnisse wurden bald danach von einer Reihe deutscher Autoren (*H. Gross :* Klin. Wschr. 6 : 228, 1927, Cbl. f. Bakt. O. I. 122—354—1927 ; *H. Braun :* Methoden der exper. Wundinfektionen, Monogr. 1929, usw.) bestätigt und später überall die sog. »Koagulase-Positivität« als das sicherste Zeichen der Pathogenität anerkannt, obwohl man an meinen diesbezüglichen ersten Veröffentlichungen meistens mit Stillschweigen vorbeigeht. Die Koagulase-Positivität ist in der medizinischen Literatur in den letzten Jahrzehnten so geläufig geworden, dass ich für die Benennung der pathogenen St die Bezeichnung »koagulierende St« vorschlagen möchte, ähnlich der Gruppenbezeichnung der »hämolysierenden Streptokokken«. Die Abtrennung : St aureus und albus ist praktisch schwer durchführbar. Das Pigment entsteht nämlich manchmal erst nach mehreren Tagen bei Zimmertemperatur. Es kommen aber einerseits nichtkoagulierende Aureus- und andererseits koagulierende Albus-Stämme vor. Die Kolonien sind dabei nicht immer einheitlich : Albus and Aureus können vermischt sein, manchmal mit einem nur kaum sichtbaren Aureus-Farbton.

Dieser einfache Pathogenitätsnachweis ermöglichte das Studium der Verbreitung der St. So haben in den vierziger Jahren englische und französische Autoren die interessante Beobachtung gemacht, dass die menschliche Nasenhöhle das Hauptreservoir der pathogenen St darstellt. Siehe die zusammen-

*Vortrag, gehalten in der Sitzung der Ungarischen Mikrobiologischen Gesellschaft in Budapest am 25. September 1953. Die Untersuchungen wurden hauptsächlich in den Laboratorien des Gesundheitshauses Budapest X und im Institut für Sporthygiene ausgeführt. Ich spreche den Leitern der obigen Anstalten meinen Dank aus und bin besonders dankbar für die liebenswürdige Mitwirkung der Oberärzte Dr. Aladár Kőváry, Doz. Dr. Salac, Dr. Elisabeth Sárfy, Dr. Edmund Füsthy, Dr. Anna Szász, Doz. Dr. Torzsai-Kiss.

fassenden Artikel v. *Kourilsky :* Rev. d' Immunol. 1/2—53—1942, Presse méd, 417—1951 ; *J. Pillet :* Thèse pour le doctorat, Paris, Imprim. R. Foulen. 1948 ; *J. O. Forfar :* Brit. Med. J., 2—170—1953 ; *Ph. M. Rountree—Barbour—Thomson*, Lancet 1—435—1951, usw. Über die Zahl dieser nasalen Kokkenträger sind jedoch ziemlich widersprechende Angaben zu finden. Ich habe daher diese Frage wieder aufgenommen und mehrere hundert Personen auf Kokkenträgertum untersucht und somit die Verbreitung der pathogenen St einem gründlichen Studium unterzogen. Dabei habe ich mehrere bisher nicht beobachtete Tatsachen zu erkennen Gelegenheit gehabt.

Für die Untersuchungen arbeitete ich eine neue Methode aus, nämlich eine sog. »*Schmierplatten-Methode*« anstelle der bisherigen Verfahren, die auf die Gewinnung von isolierten Kolonien trachteten. Das Untersuchungsmaterial entnimmt man aus dem vorderen, unteren Teil der Nasenhöhle mit einem sterilen, an ein Stäbchen befestigten Wattebausch und trägt es auf eine gewöhnliche Petri-Agarplatte ohne Fraktionierung. Auf einer Petri-Platte kann man — mit Tinte eingezeichnet — 8-9 Ausstriche verfertigen. Es genügt gewöhnlicher Agar, ohne jeden Zusatz, da die St sehr anspruchslos sind. Von dem so gewachsenen gemischten Bakterienrasen entnimmt man eine kleine Menge mit einer Platinöse und verreibt sie *lege artis* an der inneren Wand einer Eprouvette in 0,5 ml phys. NaCl-Lösung. Die Koagulase-Reaktion ist sozusagen spezifisch für die pathogenen St. Andere Bakterien geben die Probe nicht und ihre gleichzeitige Anwesenheit stört nicht. Nach Suspendierung der Bakterien gibt man in jedes Röhrchen je 0,5 ml Zitratblut. Menschliches, zu der Westergreenschen Probe entnommenes Blut — mehrere vermischt — verwendet man am einfachsten. Blut ist geeigneter als Plasma. Die Röhrchen kommen 4 Stunden lang in ein Thermostat von 37°C und werden dann bis zum nächsten Tag bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die Ablesung erfolgt sowohl nach 4 wie auch nach 24 Stunden, da einerseits bei einer schwachen Koagulasebildung die Gerinnung erst am nächsten Tage bemerkbar wird, und andererseits bei den sehr virulenten Stämmen infolge Fibrinolysinbildung die innerhalb 4 Stunden entstandene Gerinnung bis zum nächsten Tag sich wieder lösen und so die Probe eine negative Reaktion vortäuschen kann. Die Röhrchen müssen zur Ablesung fast horizontal gehalten werden, damit eine vielleicht nur am Boden der Eprouvette gebildete Gerinnung sichtbar wird. Die Gewinnung isolierter Kolonien ist auch deshalb nicht empfehlenswert, weil ein solches Verfahren zu empfindlich ist und einzelne zufällige St noch kein Trägertum bedeuten. Die Erreichung von Reinkulturen ist aber auch nicht ganz überflüssig, besonders wenn es sich um eine Phag-Typisierung oder Resistenzbestimmung gegen Antibiotika handelt.

In erster Linie untersucht man auf das Bestehen eines *nasalen* Kokken-Trägertums. Das Verfahren ist besonders bei Säuglingen und Kindern einfacher, als wenn das Material aus dem Rachen entnommen wird. Jedenfalls habe ich bei 113 Individuen beide Methoden angewendet. Die Zahl der nasalen Kokkenträger war dabei 42 = 37%, die der pharyngealen Träger 26 = 23%. In 10 Fällen = 9% waren St nur im Pharynx vorhanden. Die Untersuchungen anderer Körperstellen auf Trägertum sind zwecklos. Haut- und Konjunktiva-Träger existieren nicht. Die dort zufällig gefundenen koagulierenden St sind meistens nur mit dem Nasen-, seltener mit dem Rachen-Sekret hingelangt.

Unter 203 Personen waren 73 = 36% nasale Träger. Diese Leute von verschiedener Beschäftigung und Altersklasse kamen zu Eignungs- und Reihenuntersuchungen ins Gesundheitshaus, Budapest X, vom 12. Juli bis 3. Okt. 1952. In einer weiteren Gruppe von 89 Personen waren 30 = 33% nasale Träger. Diese meist gesunden Sportler und Sportlerinnen kamen ins Institut für Sporthygiene vom 9. März bis 8. Juni 1953. Die etwas höhere Prozentzahl der vorigen Gruppe lässt sich vielleicht durch die wärmere Jahreszeit erklären, ähnlich

wie wir es bei Typhus, Dysenterie, Poliomyelitis usw. beobachten. Der Unterschied bezüglich Geschlecht, Alter und Beschäftigung war unwesentlich. In der Altersklasse von 2—9 Jahren waren unter 83 Individuen 31 = 37% positiv. Von 138 Zehnjährigen und Älteren waren 48 = 30% positiv. Im ersten Lebensjahr — den ersten Lebensmonat abgerechnet — waren von 57 Kindern 21 = 37% positiv.

Von den Untersuchten waren 25 Geschwisterpaare. Die Paare — hauptsächlich kleine Kinder — wohnten zusammen bei den Eltern. Bei den einzelnen Paaren wuchs von der Nasenhöhle eine auffallend ähnliche Bakterienflora. Von den 25 Paaren waren die Ergebnisse bei 18 Paaren konkordant, u. zw. bei 7 Paaren beide positiv und bei 11 beide negativ. Verschieden war das Resultat bei 7 Paaren, und von diesen war bei 5 das eine Kind stark positiv und das andere negativ, bei 2 Paaren war das eine Kind negativ und das andere nur schwach positiv. Das interessante Verhalten dieser Geschwisterpaare kann auf ähnliche Infektions- und Dispositionsfaktoren zurückgeführt werden.

Untersuchungen in kleinerem Massstab führte ich beim Krankenhauspersonal aus. Das der Infektion mit koagulierenden St am meisten ausgesetzte Personal der chirurgischen und urologischen Abteilung zeigte eine 30%ige Positivität, 7 von 24. Demgegenüber waren beim Personal in der Abteilung für Geburtshilfe mehr als die Hälfte Kokkenträger (von 15 Untersuchten 8). Obwohl die Zahl der Untersuchten niedrig war, zeigte mir jedoch dieses Ergebnis den Weg zu den weiteren Untersuchungen, in denen ich den Grund dieses interessanten Umstandes aufzuklären versucht habe. Die Ursache habe ich nun bei der Untersuchung der jungen Säuglinge bald aufgedeckt.

Es gibt nämlich nur eine Altersklasse, welche von dem 33—36%-Trägertum eine wesentliche Abweichung aufweist, u. zw. die Säuglinge im Alter von unter einem Monat, aber über einen Tag. Von 64 solchen Säuglingen waren 56 = 87,5% positiv. Das Trägertum tritt aber erst ungefähr einen Tag nach der Geburt auf. Bei Säuglingen von 1, 5, 7, 10, 12, 18, 19 (3 Fälle), 21 und 23 (2 Fälle) Stunden nach der Geburt blieben die beschickten Platten entweder steril oder sie enthielten höchstens einige Albus-Kolonien. Nur in einem Falle fanden sich koagulierende St bei einem 23stündigen Säugling. Nach der 24. oder eher nach der 30. Stunde wuchsen aber meist im dicken Rasen gelbe koagulierende St beinahe in 90% der Fälle. Diese Tatsache war bei anderen Untersuchern nicht so auffallend, die ungefähr 60% Positivität fanden (*G. Martyn*: Brit. Med. J. 1—710—1949). Den von mir als »sterile Periode« bezeichneten Zeitraum von einem Tag muss man daher abrechnen. So ist die Zahl der Positiven viel grösser. Auf die Virulenz dieser Säuglings-St weist der Umstand hin, dass sie nicht nur Fibrinogen-Koagulase, sondern auch oft Fibrinolysin erzeugen, so dass die in 4 Stunden entstandene Gerinnung des Zitratblutes nach 24 Stunden wieder in Lösung geht.

Woher stammen nun diese koagulierenden St des Säuglings? Sie tauchen ähnlich den Coli-, den Bifidus-Bakterien im Darm oder den Döderlein-Stäbchen

in der Vagina auf, wir wissen nicht wie und auf welchem Wege. Man würde bei den St zuerst an den Durchgang durch den Geburtskanal, an eine Infektion von der Vaginal-Schleimhaut her denken. Ich habe daher den Vaginalschleim von 15 gesunden Schwangeren im 9. Monat — fast unmittelbar vor der Niederkunft — untersucht. In keinem Falle fand ich koagulierende St. Auch bei 15 nicht-schwangeren Frauen waren in der Vagina nur einmal koagulierende St, nämlich bei einer Frau mit Diabetes und mit einem operierter, aber noch eiternden Karbunkel am Nacken. Die Lochien von 10 Wöchnerinnen zeigten am ersten Tag ebenfalls noch keine koagulierenden St. Diese erschienen erst vom 2. Tage an und waren aus 27 Fällen in 9, d. h. nur in einem Drittel nachweisbar. Sie waren hier bei weitem nicht in einer so grossen Zahl vorhanden und nicht so stark koagulierend wie bei den Säuglingen. Die Zahl der nasalen Träger betrug unter 68 schwangeren Frauen nur 18—26,4% : eher weniger als der Durchschnitt. Viel mehr Träger waren allerdings bei den Wöchnerinnen : von 76 waren 36 = 47%. Die Zahl ist aber noch immer wesentlich kleiner als bei den Säuglingen. Zu erwähnen ist noch, dass 8 Säuglinge, durch Kaiserschnitt zur Welt gebracht, alle koagulierende St hatten. Obwohl etwa die Hälfte des geburtshilflichen Personals Kokken-Träger war, zeigte die damals dort im Dienst gestandene Schwester keine koagulierenden St. Alle diese Umstände sprechen nun gegen eine Infektion des Säuglings von der Mutter und vom Pflegepersonal her. Die Milch und das Saugen kommen auch nicht in Frage. Säuglinge, die aus irgendeinem Grunde nicht an der Brust ernährt wurden, waren ebenfalls Kokkenträger. Ältere Kinder — 2 Monate und mehr — verlieren dabei die koagulierenden St trotz des weiteren Saugens. Ich habe auch an Geburtstrauma gedacht. Die Nase des Kindes wird bei der Geburt bekanntlich ganz flachgedrückt, womit das Virulentwerden der St vielleicht erklärt werden könnte. Diese Annahme fiel aber auch fort, weil Säuglinge mit Kaiserschnitt ebenfalls Kokkenträger wurden.

Hygienisch-epidemiologische Erwägungen führten mich nun zu der Überzeugung, dass die Infektion mit koagulierenden St bei den Säuglingen durch Einatmen geschieht. Ich habe als erster (*Darányi :* Arch. f. Hyg. — Qualitative Untersuchung der Luftbakterien, 1925) darauf hingewiesen, dass in menschlichen Siedlungen von allen Bakterien die St in der grössten Zahl in der Luft schweben. Ihre Zahl geht ungefähr mit der Dichte der Bewohnung parallel. Sie befinden sich auf Hautschuppen und stammen von epidermalen Abschilferungen. Unter diesen überwiegend harmlosen Albus-Kokken können hie und da auch koagulierende St vorkommen. Obwohl die Zahl dieser letzteren sehr klein ist, können doch viele von diesen in der Nase haften bleiben, in Anbetracht der grossen Menge der eingeatmeten Luft, nämlich bei einem Erwachsenen 12 m^3 in 24 Stunden und auch bei Säuglingen mehrere m^3, wenn man trotz der kleineren Lungen die grössere Atmungsfrequenz in Betracht zieht. Die Nasenschleimhaut ist dabei bei den Säuglingen für die koagulierenden St offenbar ein sehr guter Nährboden, in welchem sich wenige St selektiv vermehren können, ähnlich vielleicht wie Coli und Bifidus, welche, wenn sie auch in sehr geringer Zahl durch den Mund aufgenommen werden, im Darmkanal sich fast spezifisch stark vermehren.

Die Luft kann so im Zustandekommen des St-Trägertums eine Rolle spielen. Die Hauptsache ist aber, dass die Säuglingsnase einen guten Nährboden für die koagulierenden St darstellt. Dass im Trägertum viel weniger die Bakterien-

aufnahme als Dispositionsfaktoren eine Rolle spielen, zeigten die älteren Säuglinge in Kinderheimen, wo ich eine Trägerzahl fand (siehe oben), die kaum höher war als der Durchschnitt. Die den Durchschnitt etwas übersteigende Trägerzahl bei den Wöchnerinnen und beim Pflegepersonal lässt sich aber durch eine Massenaufnahme der koagulierenden St, von den Säuglingen stammend, erklären, wenn auch keine grössere Disposition anzunehmen ist.

Die koagulierenden St sind *ubiquitär* nur in dem Sinne, dass einzelne Stämme überall in menschlichen Siedelungen vorkommen können, in Anbetracht der grossen Zahl der Träger. Einzelne Kokken sind jedoch nicht infektionsfähig, wie es uns auch bei anderen Bakterien bekannt ist. Es muss zum Erkranken immer eine gewisse minimale Infektionsdosis überschritten werden. Die wenigen Luft-St genügen hierzu sicherlich nicht. Krankheiterzeugend wirkt meistens der Nasen- oder weniger der Pharynx-Schleim eines Kokkenträgers, besonders wenn eine grosse Menge des Schleimes irgendwie in die Haut eingeschmiert wird. Die koagulierenden St sind also in nicht-krankheitserregender Menge überall verstreut, sind jedoch in infektionsfähigen Mengen, gleichsam in Agglomerationen nur bei den nasalen und seltener bei den pharyngealen Trägern vorhanden.

Die St der Säuglinge sind nicht ganz harmlos. Dies wird durch die vielen Staphylococcosen in dieser Altersgruppe gezeigt und auch durch die Mastitiden der stillenden Mütter, wo der Säugling die Infektionsquelle bildet, wie meine Untersuchungen es beweisen. Das nasale Trägertum ist auch späterhin beinahe ähnlich aufzufassen wie eine fokale Infektion der Tonsillen mit Streptokokken. Über Untersuchungen der pathologischen Wirkung der koagulierenden St möchte ich mich aber in einem späteren Artikel befassen. Bei der mehr als 30%igen Zahl der Kokkenträger wird es aber verständlich, dass keine andere Krankheit so verbreitet ist wie die Staphylococcosen, besonders wenn man Furunkel, dentale und andere Eiterungen, Akne, vereinzelte Follikulitiden usw. in Betracht zieht, von welchen kaum jemand in seinem Leben verschont bleibt. Ich möchte nur noch darauf hinweisen, dass die St-Infektionen eine ständig wachsende Bedeutung gewinnen, besonders seit der Einführung der Antibiotika, wo wir bei der fortwährenden Steigerung ihrer Resistenz in der Bekämpfung vor immer neue Aufgaben gestellt werden.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Eine für Reihenuntersuchungen geeignete neue Methode des Koagulase-Nachweises bei Kokkenträgern wird beschrieben.

2. Von den 33—36% nasalem Trägertum von koagulierenden Staphylokokken bei normalen Personen weicht nur eine Altersklasse wesentlich ab, nämlich die der Säuglinge unter einem Monat.

3. Wenn man den ersten Tag nach der Geburt, wo noch keine oder ganz wenige Bakterien und keine koagulierenden Staphylokokken in der Nase anzutreffen sind, als »sterile Periode« abrechnet, so findet man im ersten Monat nach der Geburt in der Nase 87,5% koagulierende Staphylokokken, die meist in starkem, gelbem Rasen wachsen und eine besondere Pathogenität aufweisen.

4. Nach meinen Untersuchungen stammen diese Staphylokokken nicht von der Mutter oder vom Pflegepersonal. Sie werden durch Einatmen aufgenommen. Die Nasenhöhle des Säuglings stellt einen ausgezeichneten, sozusagen selektiven Nährboden für koagulierende Staphylokokken dar.

5. Die koagulierenden Staphylokokken sind in der Umwelt in Agglomerationen verbreitet. Diese Agglomerate werden in erster Linie durch die 33—36% nasalen Träger und weniger, in nur 23%, durch pharyngeale Träger gebildet. Von diesen Agglomerationen aus verbreiten sich die Kokken in die Umgebung. Koagulierende Staphylokokken auf der Haut stammen meistens auch von der Nase. Krankheitserregend wirkt aber bei bestehender lokaler oder allgemeiner Disposition nur eine Masseninfektion. Letztere stammt vorwiegend von einem Kokkenträger, meistens durch Einreibung des infizierten Schleimes in die Haut oder in eine Wunde.

Koagulierende Staphylokokken in der Luft und auf Gegenständen befinden sich in einer so kleinen Zahl, dass sie die Krankheit erzeugende minimale Dosis nicht erreichen. Diese Kokken sind somit ubiquitär nur hinsichtlich ihrer Verbreitung, nicht aber der krankheitsauslösenden Wirkung.

Anmerkung : Schrifttum ist im Text zu finden. Weitere Literaturangaben sind beim Verfasser anzufordern. Adresse : Professor Dr. Gy. Darányi, Budapest, VIII., Szentkirályi u. 35.

ИССЛЕДОВАНИЯ О РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ПАТОГЕННЫХ СТАФИЛОКОККОВ

Дъ. Дараньи

Р е з ю м е

Автор описывает новый метод определения коагулязы у кокконосителей, при котором имеется возможность успешной идентификации не только в случае чистых культур, но и из налетов смешанных бактерий.

Бациллоносители в 30—36%-ах являются назальными. Значительно отличается от этого только одна возрастная группа, а именно грудные младенцы моложе одного месяца. Не считая первого дня после рождения, так называемого »стерильного периода« (когда в носовой полости в очень малом количестве или совсем не выявляются бактерии), в первом месяце жизни у 85,5% грудных детей обнаруживаются коагулирующие стафилококки, растущие в большом количестве и образующие плотные желтые налеты.

На основании проведенных опытов автор установил, что эти патогенные стафилококки происходят не от матерей или обслуживающего персонала, а заносятся дыхательным путем. Носовая полость младенцев очевидно является благоприятной селективной питательной средой для коагулирующих стафилококков. Во внешней среде коагулирующие стафилококки распространены в скопленных количествах, в первую очередь у назальных (33—36%), затем в меньшей мере у фарингеальных бациллоносителей (23%). Отсюда попадают стафилококки в окружающую среду. Находимые на коже человека коагулирующие стафилококки обыкновенно бывают назального происхождения. Болезнетворными они бывают только в случае заражения массовым количеством кокков, происходящего преимущественно от кокконосителей, путем втирания в кожу или в рану носовых или ротовых выделений кокконосителей. В атмосфере и на предметах коагулирующие стафилококки находятся обычно в таком незначительном количестве, которое едва достигает минимальной заразительной дозы. С учетом вышеуказанного стафилококки могут называться убиквистами не по их болезнетворному действию, а только в отношении их распространенности.

ÜBER DIE GEGEN CORYNEBAKTERIEN ANTAGONISTISCHEN STAPHYLOCOCCUS PYOGENES-STÄMME

Von
L. VÁCZI und I. MIHÁLYFI

Staatl. Institut für Volksgesundheitswesen, Budapest

Eingegangen am 4. November 1953

Eines der interessantesten und auch in der Weltliteratur in den Vordergrund rückenden Probleme der bakteriologischen Forschungsarbeit ist die Untersuchung jener Veränderungen, die infolge der Wirkung der Umwelt in den Eigenschaften der einzelnen Bakterien eintreten. In unseren früheren Untersuchungen [1] wurde eine quantitative Veränderung im Stoffwechsel des Coli- und des Typhusbazillus festgestellt, die infolge der Wechselwirkung dieser beiden Bakterien hervorgerufen wurde und die sich in der Aktivierung des Dehydrogenase-Enzymsystems äusserte.

Als nächstes wurden die infolge der Penicillintherapie in den Eigenschaften der Staphylococcus pyogenes-Stämme eingetretenen Veränderungen untersucht [2].

Die im nachfolgenden geschilderten Beobachtungen beziehen sich nun auf die Untersuchung der Verbreitung und der Eigenschaften von Staphylococcus pyogenes-Stämmen, bei denen sich infolge der Wechselwirkung der Bakterien antagonistische Eigenschaften ausgebildet hatten.

Die Untersuchungen wurden mit 351 Staphylococcus pyogenes-Stämmen durchgeführt. Die Stämme gehörten ihrer Herkunft nach in drei Gruppen, u. zw. in Stämme, die 1.) aus Rachenabstrichen, 2.) aus chirurgischem und 3.) aus anderem Material gezüchtet waren.

Zur Untersuchung der Antagonisierungsfähigkeit bzw. zur Auswahl der antagonistischen Stämme wurde nach folgendem Verfahren vorgegangen. Von den Stämmen wurden aus einer 24stündigen Bouillonkultur auf der Oberfläche eines 10%igen Serumagars längs der Mittellinie Ausstriche hergestellt. Nach 24stündiger Inkubation wurde quer über die entwickelte, gleichmässige, ungefähr 3—4 mm breite Kultur mit einer im Verhältnis 1 : 10 verdünnten 24stündigen Bouillonkultur von Corynebacterium diphtheriae Typus I und II bzw. mit einer im Verhältnis 1 : 100 verdünnten Bouillonkultur eines E. coli-Stammes und eines anderen Staphylokokkenstammes je ein Streifen gezogen. Nach einer weiteren 24stündigen Inkubation konnte — wenn der untersuchte Stamm den Versuchsbakterien gegenüber tatsächlich eine antagonistische Eigenschaft besass — eine Hemmzone beobachtet werden,

die sich je nach dem Staphylococcus-Stamm 2 bis 8 mm nach beiden Seiten ausbreitete. Die antagonistischen Stämme unterschieden sich also hinsichtlich der Stärke der auf das Wachstum des anderen Bakteriums ausgeübten Hemmung.

Die Untersuchungen wurden auch bei Anwendung von durchlöcherten Agarplatten wiederholt. Diese Platten wurden auf die bei der Penicillinbestimmung üblichen Weise hergestellt, mit dem Unterschied, dass an Stelle des

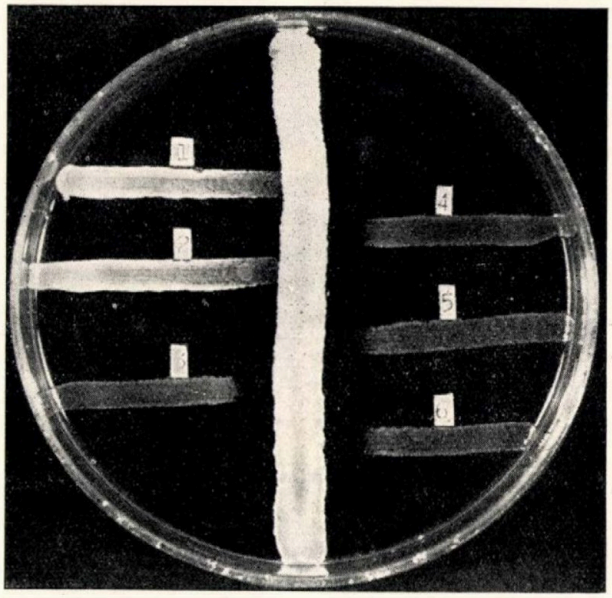


Abb. 1. Untersuchung der antagonistischen Eigenschaft verschiedener Bakterienstämme

1. E. coli
2. St. pyogenes
3. C. diphtheriae gravis
4. C. diphtheriae mitis
5. C. hoffmanni
6. C. xerosis

empfindlichen Staphylococcus pyogenes-Stammes ein C. diphtheriae-Stamm dem Agar zugegeben wurde. In die Löcher wurde 0,1 ml einer 24stündigen Bouillonkultur der antagonistischen Staphylococcus pyogenes-Stämme pipettiert, worauf sich nach 24stündiger Inkubation bei 37°C rings um die Löcher eine der Stärke der Hemmung entsprechende Hemmzone zeigte.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle I zusammengefasst.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass von den insgesamt untersuchten 351 Stämmen 10 Stämme eine dem Corynebacterium diphtheriae gegenüber antagonistische Eigenschaft aufwiesen.

Aus der Tabelle geht auch hervor, dass 8 von diesen Stämme aus der Rachenflora stammten. Von den zwei restlichen antagonistischen Stämmen

TABELLE I

Untersuchungsergebnisse der antagonistischen Eigenschaften von Staphylococcus pyogenes-Stämmen

Herkunft des Untersuchungsmaterials	Untersuchte Stämme		Stämme mit antagonistischen Eigenschaften	
	Zahl	%	Zahl	%
Rachenabstriche	122	34,8	8	6
Chirurgisches Material	140	39,9	1	0,7
Von anderen Stellen stammendes Material	89	25,3	1	1
Zusammen	351	100,0	10	2,8

wurde der eine aus der Galle, der andere aus dem Urin gezüchtet. Vom ersteren darf angenommen werden, dass er gleichfalls aus dem Rachen herrührte.

Im weiteren wurde dann untersucht, ob die 10 antagonistischen Stämme auch anderen Bakterien gegenüber antagonistische Eigenschaften aufweisen. Die zu diesen Untersuchungen herangezogenen Versuchsbakterien waren: S. typhi, S. paratyphi, Sh. paradysenteriae, Klebsiella pneumoniae, Streptococcus pyogenes haemolyticus, Str. viridans, Neisseria meningitidis, Str. pneumoniae, Haemophilus influenzae, verschiedene Corynebakterien (Corynebacterium hoffmanni, Corynebacterium xerose, andere apathogene Corynebakterien sowie zahlreiche andere Stämme des pathogenen Corynebacterium diphtheriae). Bei diesen Versuchen konnte eine antagonistische Wirkung nur gegenüber den Corynebakterien beobachtet werden.

Die biochemischen Eigenschaften der antagonistischen Stämme sind in Tabelle II angegeben.

TABELLE II

Biochemische Eigenschaften der antagonistischen Staphylococcus pyogenes-Stämme

Stamm Nr.	Pigmentbildung	Hämolyse	Koagulasebildung	Mannitabbau	Wachstum auf 7%igem NaCl-Agar	Penicillinempfindlichkeit	Penicillinasebildung	Antagonistische Eigenschaft
2	+	+	+	+	+	< 0,05	−	++
232	+	±	+	+	+	< 0,05	−	++
569	+	+	+	+	+	< 0,05	−	+
949	+	+	+	+	+	< 0,05	−	+
39	−	−	−	−	+	< 0,05	−	++
80	−	−	−	−	+	< 0,05	−	+
10	++	±	±	+	+	< 0,05	−	+
82	+	±	+	+	+	< 0,05	−	+
143	+	+	+	+	+	< 0,05	−	++
568	+	+	+	+	+	< 0,05	−	+

Von den antagonistischen Stämmen waren 8 Staphylococcus pyogenes aureus haemolyticus. Diese bauten Mannit ab, hämolysierten und bildeten Koagulase und Pigment. Die anderen zwei Staphylococcus albus-Stämme waren in biochemischer Beziehung weniger aktiv, sie hämolysierten nicht, bauten Mannit nicht ab und erzeugten keine Koagulase. Zwischen der Pathogenität und der antagonistischen Eigenschaft konnte also kein Zusammenhang nachgewiesen werden. Unter den Eigenschaften dieser Stämme gibt es aber eine, die bei allen auffällig übereinstimmte. *Die antagonistischen Stämme waren nämlich sämtlich penicillinempfindlich.* Dies ist um so überraschender, als in unseren früheren Untersuchungen [2] die Penicillinresistenten Stämme 45% ausmachten. Dies lässt nun die Folgerung zu, dass die Stämme im Laufe der Ausbildung ihrer Resistenz ihre antagonistische Eigenschaft verlieren.

Zur Klarstellung dieser Frage wurden vier von den antagonistischen Stämmen in vitro durch Serienpassagen in Nährlösungen von stets grösserer Penicillinkonzentration dem Penicillin gegenüber resistent gemacht. Während dieses Prozesses wurden die biochemischen Eigenschaften dieser Stämme und insbesondere die Veränderung ihrer antagonistischen Eigenschaft untersucht. Die diesbezüglichen Ergebnisse sind in Tabelle III enthalten.

TABELLE III

Biochemische Eigenschaften penicillinresistent gewordener Staphylococcus pyogenes-Stämme

Stamm Nr.	Pigment-bildung	Hämolyse	Koagulase-bildung	Mannit-abbau	Wachstum auf 7%igem NaCl-Agar	Penicillin-empfindlich-keit	Penicilli-nasebildung	Antagoni-stische Eigenschaft
2	—	±	+	+	+	>500	—	—
232	—	—	+	+	+	>500	—	—
569	—	—	+	+	+	>500	—	—
949	—	±	+	+	+	>500	—	—

Die übrigen biochemischen Eigenschaften der in vitro resistent gemachten Stämme sollen hier keiner eingehenderen Untersuchung unterzogen werden, sondern es sei hier nur das Verhalten der Antagonisationsfähigkeit behandelt. Die Pigmentbildung und die Hämolysationsfähigkeit nehmen im Laufe der Entwicklung der Resistenz allmählich ab. Mit der Ausbildung bzw. der allmählichen Zunahme der Resistenz verlieren die Stämme — wenngleich langsam — auch ihre Antagonisationsfähigkeit. Es ist ein recht hoher Resistenzgrad notwendig, damit eine wahrnehmbare Verminderung dieser Eigenschaft eintrete; daraus geht hervor, dass die Antagonisationsfähigkeit sehr eng an den Stoffwechsel der Zelle gebunden ist und nur im Falle einer tiefergreifenden Veränderung des Stoffwechsels aufhört.

Es ist bekannt, dass die sich in vitro gebildete Penicillinresistenz nicht beständig, sondern temporär ist. Aus diesem Grunde wurden die resistenten Stämme, die ihre antagonistische Eigenschaft verloren hatten, mehrere Wochen hindurch bei täglicher Überimpfung in penicillinfreier Bouillon gezüchtet und danach ihre antagonistische Eigenschaft von neuem untersucht. Durch Passagen erwarben die Stämme allmählich ihre Empfindlichkeit gegen Penicillin, und parallel damit kehrte ihre Antagonisierungsfähigkeit wieder zurück.

Im nachstehenden sollen einige Eigenschaften der antagonistischen Substanz beschrieben werden. Sie bildet sich sehr leicht in Bakterien, die auf 10%igem Serumagar gezüchtet wurden. Die Züchtung dieser Bakterien auf Blut- oder Schokoladenagar zeitigt bereits schlechtere Ergebnisse. Am schlechtesten entsteht die Substanz in flüssigen Nährmedien, doch kann ihre Bildung durch sauerstoffreiche Luft gefördert werden. Die reine Substanz wurde auf Grund der Beschreibung von *Abraham* und *Florey* [3] folgenderweise dargestellt.

Der antagonistische St. pyogenes-Stamm wurde in einem flüssigen Nährmedium gezüchtet, der mit 10%igem Trypsin zersetztes Kasein, primäres und sekundäres Kaliumphosphat, Ferrosulfat und 0,25% Glukose enthielt. Diese Nährlösung wurde 5 Tage hindurch in einem Exsikkator gehalten, der täglich zweimal eine halbe Stunde mit Sauerstoff durchströmt wurde. Die Kultur wurde zentrifugiert, der pH-Wert der überstehenden Flüssigkeit auf 3 eingestellt und der Grossteil der inaktiven Stoffe niedergeschlagen. Nach Zentrifugieren wurde die Flüssigkeit neutralisiert und die antagonistische Substanz mit Trichloressigsäure von einer Endkonzentration von 6% ausgefällt, in dest. Wasser gelöst und dialysiert. Das Endprodukt war ein bräunhches, pulveriges Material, das nicht mit Seitzfilter filtriert und nicht dialysiert werden konnte.

Die Extraktion dieser Substanz wurde auch aus Serumagar versucht, doch ohne Erfolg.

Um die Erklärung für die antagonistische Wirkung zu finden, wurde untersucht, ob man es hier nicht mit einer Hemmung zu tun hat, die infolge der Bildung von Peroxyd eintritt. Da aber die antagonistische Wirkung auch bei Züchtung auf Blutagar wahrzunehmen ist und da es sich um eine selektive Wirkung handelt, die nur den Corynebakterien gegenüber in Erscheinung tritt, darf diese Möglichkeit ausgeschlossen werden.

Im weiteren wurde versucht, Angaben über den Mechanismus der antagonistischen Wirkung zu erhalten. Vor allem sollte ermittelt werden, ob die Wirkung eine bakteriostatische oder eine bakterizide ist. Zur Klärung dieser Frage wurde folgender Versuch ausgeführt. Ein antagonistischer und ein nicht antagonistischer Staphylococcus pyogenes-Stamm wurden in je 5 ml Bouillon überimpft und jede Bouillon 0,1—0,5 ml einer Corynebacterium diphtheriae-Kultur zugegeben. Aus diesen Mischkulturen wurden gewisse Mengen in Zeit-

intervallen von 24 Stunden in frische Bouillon bzw. auf Blutagarplatten überimpft. Auf jenen Blutagarplatten, die mit dem antagonistischen Staphylococcus-Stamm beimpft wurden, konnten schon nach 24 Stunden unter den unzähligen Staphylococcus pyogenes-Kolonien nur mehr wenige Diphtheriebazillenkolonien gefunden werden. Bei weiterer Überimpfung erhielt man ein ähnliches Bild, d. h. die Anzahl der Diphtheriebazillenkolonien nahm weiter ab. Dies bestätigte, dass die Vermehrung der Stämme gehemmt war und dass in den neuen Passagen lediglich die aus den eingeimpften Diphtheriebazillen gewachsenen Kolonien vorhanden waren. Im Gegensatz dazu entwickelte sich aus den mit dem nicht antagonistischen Staphylococcus-Stamm gezüchteten Kulturen selbst nach der 10. Passage zwischen den Staphylococcus-Kolonien eine grosse Zahl von Diphtheriebazillenkolonien, woraus deutlich hervorgeht, dass hier die Vermehrung in keiner Weise gehemmt wurde. Es kann sich also hier nicht darum handeln, dass der eine Stamm den anderen wegen seines rascheren Wachstums unterdrückt.

Dieser Versuch wurde auch mit demDiphtheriestamm P. W. 8 wiederholt. Die Oberfläche der Pope-Bouillon wurde mit dem Stamm P. W. 8 beimpft und die Röhrchen nach etwa 3stündiger Inkubation mit 1 ml einer 24stündigen Bouillonkultur eines antagonistischen bzw. nicht antagonistischen Staphylococcus pyogenes-Stammes inokuliert. Infolge der Wirkung des antagonistischen Staphylococcus-Stammes stand die Vermehrung an der Oberfläche still, während sie sich in den Röhrchen, in die der nicht antagonistische Stamm eingeimpft wurde, fortsetzte, wobei die Diphtheriebazillen ähnlich wie bei den Kontrollen ein starkes, sich bis zur Wand des Röhrchens erstreckendes Wachstum zeigten. *Die antagonistische Wirkung ist also nicht bakterizid, sondern bloss bakteriostatisch.*

Im folgenden wurden zur weiteren Klärung des Wirkungsmechanismus noch zwei Fragen geprüft. Es wurde nämlich die Wirkung untersucht, welche die antagonistischen Stämme einerseits auf die Toxinproduktion und andererseits auf den Atmungsstoffwechsel der Diphtheriebazillen ausüben.

Je zwei Aszites- bzw. Serumbouillons wurden mit virulenten Diphtheriebazillen beimpft, die ersten zwei Röhrchen ausserdem mit antagonistischen und die restlichen zwei mit nicht antagonistischen Staphylococcus pyogenes-Stämmen.

Mit diesen Mischkulturen wurden nach 24 bzw. 48 Stunden mit der von *Elek* [4] beschriebenen und in unserem Institut von *Lányi* modifizierten Methode Toxinbestimmungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind aus Tabelle IV ersichtlich.

Derselbe Versuch wurde mit mehreren Corynebacterium diphtheriae-Stämmen wiederholt, wobei sich das gleiche Resultat ergab. Dieses Versuchsergebnis bestätigt gleichzeitig auch die Tatsache, dass das Toxin des Diphtheriebazillus das Produkt eines Synthetisierungsprozesses darstellt.

TABELLE IV

Toxinbildung der Mischkulturen

Mischkultur	Toxinbildung
Diphtheriebakterien + antagon. Stamm	—
Diphtheriebakterien + antagon. Stamm	—
Diphtheriebakterien + nichtantag. Stamm	+
Diphtheriebakterien + nichtantag. Stamm	+

In Tierversuchen (Meerschweinchen) wurde festgestellt, dass bei gleichzeitiger Gabe von gereinigter antagonistischer Substanz und von Diphtherietoxin die Bildung des Geschwürs nicht verhindert wird, selbst dann nicht, wenn die beiden Substanzen zuerst 24 Stunden hindurch zusammen gehalten und dann eingeimpft werden.

Wird der Diphtheriebazillus zusammen mit der antagonistischen Substanz intrakutan verabreicht, so entsteht kein Geschwür.

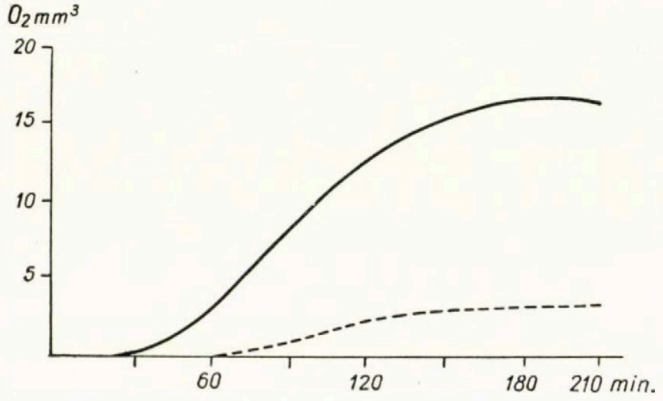


Abb. 2. Der Sauerstoffverbrauch während des Wachstums von Corynebacterium diphtheriae. (Vorinkubation: 30 Min.; Gesamtvolumen: 3,1 ml; 2,6 ml Pope-Bouillon + gewaschene Löfflerkultur von C. diphtheriae suspendiert in 0,5 ml phys. NaCl.)
———— C. diphth. in Pope-Bouillon
— — — — — C. diphth. in antagonistische Substanz enthaltender Pope-Bouillon

In einer weiteren Versuchsserie wurde der Einfluss der antagonistischen Substanz auf den Atmungsstoffwechsel der Diphtheriebazillen im Warburgapparat untersucht. Zu diesem Zwecke wurde die gewaschene Suspension einer 24stündigen Löfflerkultur des Diphtheriebazillus in eine antagonistische Substanz enthaltende bzw. nicht enthaltende Pope-Bouillon geimpft und nach

30 Minuten Vorinkubation der Sauerstoffverbrauch während des Wachstums gemessen. Die so ermittelten Werte sind in Abb. 2 dargestellt.

Es ist ersichtlich, dass der Atmungsprozess infolge der Wirkung der antagonistischen Substanz — im Gegensatz zum Kontrollversuch — gehemmt ist.

Schliesslich wurde auch versucht, Staphylococcus pyogenes-Stämme mit antagonistischen Eigenschaften in vitro herzustellen. Zu diesem Zwecke wurde ein Staphylococcus pyogenes-Stamm längere Zeit hindurch zusammen mit Diphtheriebazillen in Mischkulturen gezüchtet, wobei die Stämme täglich in frische Bouillon überimpft wurden. Die Passagen und das Zusammenleben riefen aber beim Staphylococcus pyogenes-Stamm selbst nach mehreren Monaten keine antagonistische Eigenschaft hervor.

Diskussion

Die funktionellen Veränderungen, welche an den Bakterien infolge des Einflusses der Umweltsfaktoren eintreten, *können in verschiedenen Formen in Erscheinung treten.* So z. B. in der quantitativen Veränderung, in der Zu- oder Abnahme des Stoffwechsels, in der Bildung eines neuen, im Stoffwechsel des Bakteriums bisher nicht vorhandenen Fermentes oder in der Bildung einer oder mehrerer Substanzen, welche die Lebensfunktion einer anderen Mikrobe ungünstig beeinflussen. Die hier geschilderten Untersuchungen erstreckten sich auf dieser letzteren Eigenschaft der Staphylococcus pyogenes-Stämme.

Über die antagonistischen Eigenschaften der Bakterien der Staphylococcus pyogenes-Gruppe sind in der Literatur zahlreiche Angaben vorhanden. Schon 1885 berichtete *Babes* [5] und 1887 *Pawlowsky* [6] über solche Beobachtungen. Im Jahre 1909 beschrieb *Schiötz* [7], dass in einem Diphtheriespital Diphtheriebazillenträger nach einer interkurrierenden Staphylokokkenangina keimfrei wurden.

Seit dieser Zeit beschäftigten sich zahlreiche Forscher mit dieser Frage (*Lorentz* und *Ravend* [8], *Berger* [9], *Gillissen* [10], *Schilling* [11] usw.), bis dann im Jahre 1932 *Du Jardin-Beaumetz* [12] mitteilte, dass die bei einigen Staphylokokken wahrnehmbare Coryne-Hemmung die Folge der Produktion eines antibakteriellen Materials ist. Ähnlicherweise berichteten dann *Sobolewa* und *Isabolinski* [13] sowie *Korolew* [14] über von Staphylokokken produzierte, anderen Bakterien gegenüber antagonistische Substanzen. *Duliscuet* [15] beschreibt gleichfalls die antagonistische Eigenschaft von Staphylococcus-Stämmen gegenüber Corynebacterium diphtheriae. Bei gleichzeitiger Gabe des Diphtheriebazillus mit dem antagonistischen Stamm oder mit dessen Extrakt konnte an Meerschweinchen die Toxinwirkung der Diphtherie neutralisiert werden.

Im Jahre 1947 untersuchten *Jennings* und *Sharp* [16] 205 Staphylococcus pyogenes-Stämme hinsichtlich ihrer antibakteriellen Aktivität gegen-

über E. coli, C. diphtheriae, C. xerosis und Staphylococcus pyogenes. Von den untersuchten Stämmen erwiesen sich von den aus Nase und Rachen stammenden 20 als aktiv, 116 als inaktiv, von den aus Wunden stammenden 3 als aktiv und 51 als inaktiv, von verschiedenen anderen Stämmen keiner als aktiv und 12 als inaktiv. Von den 3 Staphylokokkenstämmen, die aus dem Rachen von Diphtheriekranken stammten, waren alle 3 aktiv. Von den untersuchten Mikroorganismen hemmten sämtliche aktiven Stämme C. xerosis, während C. diphtheriae und Staphylococcus pyogenes aureus von den meisten und E. coli von keinem der aktiven Stämme gehemmt wurde.

Von den von uns untersuchten Stämmen wiesen 2,8% eine antagonistische Eigenschaft gegenüber Corynebakterien auf. Von den aus der Rachenflora gezüchteten Staphylococcus pyogenes-Stämmen waren 6% antagonistisch, während die von anderen Stellen stammenden Staphylokokken diese Eigenschaft nur zu 0,9% besassen. Diese Tatsache weist auf den Ursprung und die Art der Ausbildung der antagonistischen Stämme hin, da die im Rachen lebenden Stämme mit den Corynebakterien in Berührung kamen, deren häufigstes Angriffsfeld ebenfalls die Schleimhäute von Nase und Rachen sind. Infolge des wiederholten Zusammentreffens dieser Mikroorganismen dürfte sich nun der Antagonismus ausgebildet haben. Dieser Antagonismus bezieht sich auf die ganze Corynegruppe. Dies deutet darauf hin, dass der Stoffwechsel der Corynebakterien in seinen Grundlagen (Atmung, Vermehrung) einheitlich ist, doch von dem der übrigen Bakterien abweicht.

Die antagonistische Eigenschaft ist stark an den Stoffwechsel des Bakteriums gebunden und steht mit der Pathogenität des betreffenden Stammes in keinerlei Zusammenhang.

Die sich in den letzten Jahren infolge der Penicillintherapie ausbildenden resistenten Varianten der Bakterien der Staphylococcus pyogenes-Gruppe können in stets grösserer Menge unter den übrigen Bakterien der Rachenflora nachgewiesen werden. Der Stoffwechsel dieser neuen Bakterien hat sich während der Ausbildung der Resistenz stark verändert, und infolgedessen haben die Bakterien diese ihre zuvor erworbenen Eigenschaften verloren. Die Richtigkeit dieser Erklärung scheint durch den Umstand bewiesen, dass einerseits unter den antagonistischen Stämmen kein einziger resistenter Stamm gefunden wurde, und andererseits, dass diese Stämme in unseren in vitro-Experimenten im Laufe der Erwerbung ihrer Resistenz ihre antagonistische Eigenschaft allmählich verlieren, d. h. dem anderen schädigenden Einfluss aus der Umwelt gegenüber schutzlos werden.

Bei diesen Überlegungen war auch die Tatsache von Bedeutung, dass *Jennings* und *Sharp* [16] im Jahre 1947 bei der Untersuchung von 205 Staphylococcus-Stämmen in der Rachenflora noch 17,5% Staphylococcus pyogenes-Stämme vorfanden, die den Corynebakterien gegenüber antagonistisch waren, während wir sechs Jahre später bei einer ungefähr gleich grossen Zahl von

untersuchten Stämmen nur noch 6% solcher Stämme nachzuweisen vermochten. Während dieser Zeitspanne hat nun laut der diesbezüglich ziemlich übereinstimmenden Literaturangaben die Zahl der resistenten Staphylococcus pyogenes-Stämme im Rachen in starkem Ausmass zugenommen.

Was den Mechanismus der antagonistischen Wirkung anbetrifft, können unsere Beobachtungen wie folgt zusammengefasst werden. Der antagonistische Faktor ist wahrscheinlich eine eiweissartige Substanz, dessen Angriffspunkt das Atmungsfermentsystem der Corynebazillen sein dürfte. Nach den neuesten Forschungen (*Pappenheimer* und andere) ist das Diphtherietoxin die Proteinkomponente eines eisenhaltigen Atmungsfermentes, das wahrscheinlich mit dem Cytochrom B identisch ist. Es ist möglich, dass die antagonistische Substanz das Atmungssystem und infolgedessen die Toxinbildung des Diphtheriebazillus angreift. Es wirkt nicht auf das bereits gebildete und ausgeschiedene Toxin, sondern verhindert nur dessen Bildung. Es muss als wahrscheinlich angenommen werden, dass die antagonistische Substanz eine der Entwicklungsphasen des inneren fermentativen Kettensystems bzw. der energieproduzierenden Prozesse blockiert, die zum Wachstum des Diphtheriebazillus notwendig sind, wodurch dann die Atmung des Bakteriums, die Ausbildung seiner biologischen Tätigkeit verhindert wird. Diese Auffassung wird durch jene Beobachtungen gestützt, aus denen ersichtlich ist, dass die antagonistische Substanz den Atmungsstoffwechsel des Bakteriums fast auf Null senkt. Es hält die Corynebakterien in einem Ruhezustand, ohne dass es sie abtötet.

Die Rachenflora ist infolge der gesteigerten Penicillintherapie in Umbildung begriffen. Im Rachen können in immer grösserer Zahl penicillinresistente Staphylokokkenstämme gefunden werden, welche ihre antagonistische Wirkung gegenüber den Diphtheriebakterien verloren haben. Dies lässt es nicht ausgeschlossen erscheinen, dass die Zahl der Diphtheriebazillenträger und der Diphtheriefälle bei Erwachsenen in der Zukunft zunehmen wird.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wurde die antagonistische Eigenschaft von 351 von verschiedenen Stellen stammenden Staphylococcus pyogenes-Stämmen gegenüber verschiedenen anderen Bakterienarten untersucht. Von den untersuchten Stämmen zeigten 10 (2,8%) eine antagonistische Wirkung gegenüber den Corynebakterien. Die meisten antagonistischen Stämme (6%) konnten in der Rachenflora gefunden werden, im Gegensatz zu den Stämmen, die aus anderen Auswürfen und Ausstrichen gezüchtet wurden (0,9%).

2. Von den antagonistischen Stämmen waren 8 Staphylococcus pyogenes aureus haemolyticus und 2 Staphylococcus pyogenes albus. Zwischen der Pathogenität und dem Antagonismus der Stämme besteht kein Zusammenhang. Die Stämme wiesen in bezug auf die Stärke der antagonistischen Wirkung Unterschiede auf. Eine charakteristische Eigenschaft sämtlicher Stämme war, dass sie Penicillin gegenüber empfindlich waren (selbst bei einer Konzentration von nur 0,05 E/ml Penicillin war kein Wachstum festzustellen).

3. Die antagonistische Eigenschaft ist stark an den Stoffwechsel des Bakteriums gebunden und verschwindet nur nach einer grösseren Veränderung des Stoffwechsels. Werden die antagonistischen Stämme in vitro resistent gemacht, so verlieren sie allmählich ihre Antagonisationsfähigkeit.

4. Die antagonistische Wirkung ist ein selektiver Antagonismus, der sich gegenüber den Corynebakterien zeigt. Die Wirkung ist bakteriostatisch und nicht bakterizid.

5. Die antagonistische Substanz bildet sich leicht in Bakterien, die auf Serumagar gezüchtet werden. Ihre Bildung wird durch Sauerstoff gefördert. Sie lässt sich nicht dialysieren, ist wärmelabil und übt auf das fertige Toxin keine Wirkung aus. Ihr Angriffspunkt ist auf Grund der durchgeführten Züchtungs-, Atmungs- und in vivo-Versuche wahrscheinlich das Atmungsfermentsystem der Corynebakterien.

6. Trotz längerer, gemeinsamer Kultivierung der Staphylococcus pyogenes-Stämme mit Corynebacterium diphtheriae gelang es nicht, aus ersteren Stämme mit antagonistischen Eigenschaften zu züchten.

LITERATUR

1. *Váczi, L.:* Im Druck.
2. *Váczi, L.* und *Mihályfi, I.:* Orvosi Hetilap, **94**, 1097 (1953).
3. *Florey, H. W., Chain, E.:* Antibiotics. London—New York 1949.
4. *Elek, S.:* Brit. Med. J. **1**, 493 (1948).
5. *Babes, V.:* J. Con. Med. Prat. Paris, **7**, 321 (1885).
6. *Pawlowsky, A. D.:* Arch. path. Anat. Physiol. **108**, 494 (1887).
7. Zit. *Gillissen* [10]
8. Zit. *Gillissen* [10]
9. *Berger, M.:* Schweiz. Med. Wschr. **81**, 130 (1951).
10. *Gillissen, G.:* Zbl. f. Bakt. I. Ref. **151**, 161 (1953).
11. *Schilling, C.:* Zbl. f. Bakt. I. Orig. **127**, 276 (1933).
12. *Du Jardin-Beaumetz, E.:* Compt. rend. soc. biol. **110**, 1210 (1932).
13. *Sobolewa, R. M., Isabolinski, M. P.:* Zbl. Bakt. I. Orig. **133**, 107 (1934).
14. Королев, П. А.: Журнал Микробиол., Эпидемиол. и Иммунбиол. **4**, 35 (1939).
15. *Duliscuet, R., Ballet, B.:* Presse Méd. **43**, 1298 (1935).
16. *Jennings, M. A., Sharp, A. E.:* Nature **159**, 133 (1947).

МЕСТОНАХОЖДЕНИЕ И СВОЙСТВА ШТАММОВ STAPHYLOCOCCUS PYOGENES, ОБЛАДАЮЩИХ АНТАГОНИСТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ ПО ОТНОШЕНИЮ К БАКТЕРИЯМ ГРУППЫ CORYNE

Л. Ваци и И. Михалъфи

Резюме

1. Авторы исследовали антагонистические свойства изолированных из 351 различного места штаммов Staphylococcus pyogenes по отношению к другим видам бактерий. Из исследованных штаммов 10 (2,8%) антагонизировали бактерии, принадлежащие к группе Coryne. Антагонистические штаммы были найдены во флоре гортани в преобладающем количестве (6%), по сравнению с количеством штаммов, выделенных из других мест (0,7 1,0%).

2. Из изолированных антагонистических штаммов 8 были Staphylococcus pyogenes aureus haemolyticus, а 21 Staphylococcus pyogenes albus. Между патогенностью и антагонистическими свойствами штаммов зависимости нет. Штаммы отличаются друг от друга в отношении интенсивности образования антагонизирующих веществ. Характерным свойством штаммов являлась их чувствительность к пенициллину. (Они не росли даже при концентрации пенициллина в 0,05 Е.)

3. Антагонистические свойства в сильной степени связаны с обменом веществ бактерий, и зависимость эта прекращается только в случае резкого изменения последнего. Если антагонистические штаммы in vitro станут резистентными, то они постепенно теряют свои антагонистические свойства.

4. Антагонистическое действие является селективным антагонизмом, распространяющимся на бактерии группы Coryne. Действие это является бактериостатическим, а не бактерицидным.

5. Антагонистические вещества легко производятся на сывороточном агаре. Богатая кислородом атмосфера увеличивает их производительность. Речь идет о недиализируемом и термолябильном, белкоподобном веществе. Антагонистические вещества не действуют на уже образованный токсин. На основании опытов культивирования, дыхательных и in vivo опытов, точкой приложения вероятно является дыхательный фермент коринебактерий.

6. Штаммам Staphylococcus pyogenes, выращиваемым совместно со штаммами Corynebacterium diphtheriae в течение продолжительного времени, не удалось присвоить антагонистических свойств.

AETIOLOGY OF THE 1953 INFLUENZA EPIDEMIC IN HUNGARY

By
E. FARKAS and I. DÖMÖK

Institute for Public Health, Budapest

Received November 10, 1953

In January and February, 1953, an influenza epidemic occurred in Hungary. A description of its course is to be found in a paper by *Petrilla* [1]. In the present communication aetiological studies carried out during the epidemic period are reported.

Materials and methods

Strains of virus. The origin of laboratory strains and the designation of Hungarian strains have been described in a previous paper by the present authors (2). Except for strains PR8, Lee and Budapest 4/49, all other strains involved went through less than ten passages at our laboratory.

The methods employed have also been described (2). The only difference was that in the case of small children and infants material was taken from the laryngeal vestibule, by means of a cotton swab. The material so obtained was immediately washed into 2 ml of broth, which from then on was treated as if it were a throat gargling.

Experimental

Strains of virus isolated during the epidemic. In order to isolate virus, 145 materials have been worked up. Of these, 94 were samples taken from the laryngeal vestibule of children under 10 years of age and 51 were throat garglings from subjects older than 10 years. Of the 145 patients, 125 lived in Budapest and 20 in the country. The latter were without exception older than 10 years and lived in 5 distant areas of the country. The test materials treated with antibiotics were inoculated into 8- and 11-day old embryonated eggs.

Thirteen influenza virus strains were isolated. Of these 11 proved to be influenza B, one was A-prime and one was influenza C. Eight B strains were isolated from subjects living in Budapest, two from Kecskemét and one from Szeged, while the influenza A-prime strain originated from Budapest and the influenza C from Esztergom. Five influenza B strains were isolated from subjects under the age of ten years, of whom one was five months old and another 20 months old. The A-prime strain was recovered from a 10-month old baby.

In the first passages the B strains multiplied exclusively in the amnion sac and agglutinated guinea pig red cells in dilutions about 4 to 8 times higher

than necessary for the agglutination of chick red cells. Also in later passages, these strains could be adapted to the allantoic sac only with some difficulty. They grew somewhat better in 11-day-old eggs than in 8-day-old ones. The only A-prime strain produced in the first 5 passages embryonal fluids of a very low HA titer, the amniotic fluid was not infrequently negative, while in other instances the allantoic fluid also haemagglutinated. From the 6th passage on, the amniotic and the allantoic fluids agglutinated chicken and guinea pig red cells at an approximately similar titre.

The relation of new strains to each other and to older laboratory strains was studied by means of cross HI tests. Immune sera from Syrian hamsters were used. The hamsters were immunized with 3rd to 5th passage material of the new strains, as described elsewhere [2]. Eight to ten hamsters were immunized with each strain, sera from 2 to 3 hamsters were pooled and the cross HI tests were usually set up with 3 pooled immune sera each. — At least 2, but most frequently 3, parallel tests were carried out with the same sera, i. e. the index numbers showing the relation of strains (»d« values) are means calculated from the results of 6 to 9 parallel tests. The method of calculating »d« values has been described elsewhere [2]. Theoretically, the higher the value of this index number, the more probable that the two strains involved differ in antigenic structure. Are the 2 strains tested identical, the value of »d« diverges from 0 only within the limits of experimental error, which exceeded 3 in only about 5 per cent of the cases, the number of parallels being as mentioned.

The »d« values showing the relation of the 1953 influenza B strains to each other do not vary between any wider limits. The 55 index numbers are not shown one by one, only »d« values indicating the relation of each strain to the other ten strains (Table I).

TABLE I

Means of »d« values showing the relationship of each of the 11 influenza B strains to the other 10 strains

Designation of strain	Bp. 1/53	Bp. 2/53	Bp. 3/53	Bp. 4/53	Bp. 5/53	Bp. 6/53	Hung. 7/53	Hung. 8/53	Hung. 9/53	Bp. 10/53	Bp. 11/53
Means	−0,65	+0,65	−0,09	+0,35	+0,38	−0,25	−0,65	+0,10	− 0,53	−0,13	+0,41

The highest number in Table I is +0,65, and the lowest one −0,65; the mean of the 55 index numbers is − 0,04. In contrast with this, the »d« values showing the relation of the single strains from the year 1953, to strain Budapest 1/49 yielded a mean of 4,1 (Table II), i. e. more than 6 times as much as the highest number in Table I. Even greater is the divergence of the new strains from the Czech one and they are so different from the Lee strain that an accurate »d« value cannot be calculated.

TABLE II

Means of »d« values showing the relationship of each of the older influenza B strains to the 11 new strains

Designation of strain	Bp. 1/49	Czech 1949	Lee
Means	4,1	11,4	>31

The relation of the influenza A-prime strain Bp. 12/53 to the 6 older A-prime strains is shown in Table III.

TABLE III

»d« values showing the relationship between influenza A-prime strains

	Liverpool	Sweden 3/50	Paris	Bp. 4/49	Hung. 1/52	Hung. 2/52
Bp. 12/53	2	10	8	5	6	40
Liverpool	—	10	15	18	9	36
Sweden 3/50	—	—	6	28	6	28
Paris	—	—	—	11	10	42
Bp. 4/49	—	—	—	—	15	35
Hung. 1/52	—	—	—	—	—	17

The new strain differs from the 1951 Liverpool (England 1/51) strain only in that it is more closely related to the 1949 Hungarian and Paris strains than the latter. Similarly to the Liverpool strain, the new strain differs from strains Sweden 3/50, Hung. 1/52 and 2/52. It is striking how strain Hung. 2/52 differs from all other strains. HI tests failed to reveal any relationship between the new strain and strains PR8 and Lee.

The recently recovered influenza C strain was reported upon in some detail elsewhere [3]. This strain is almost identical with *Taylor's* strain 1233.

Serological Studies. Complement fixation tests involving human sera are divided into five groups.

1. Tests with single blood samples from 1140 adults, with clinical symptoms of, or convalescing from, influenza.

2. Tests with single blood samples from 64 children, 2 to 10 years old, in similar condition.

3. Tests with single blood samples from 152 babies, 1 to 24 months old, in similar condition.

4. Tests with 103 pairs of sera.

5. Tests with 501 sera sent in for syphilis serology.

The distribution of the titres in group 1 is shown in the Figure. Most of the blood samples belonging to this group had been obtained from influenza departments of Budapest hospitals.

It must be noted that in most instances it was not possible to determine exactly on which day of the disease the sample had been taken. A considerable number of sera must have originated from the first days of the illness, when no rise in titre is yet to be expected.

It is clearly shown how many more sera yielded a high titre to influenza B, than to influenza A or C. Many of the sera showed also influenza A complement

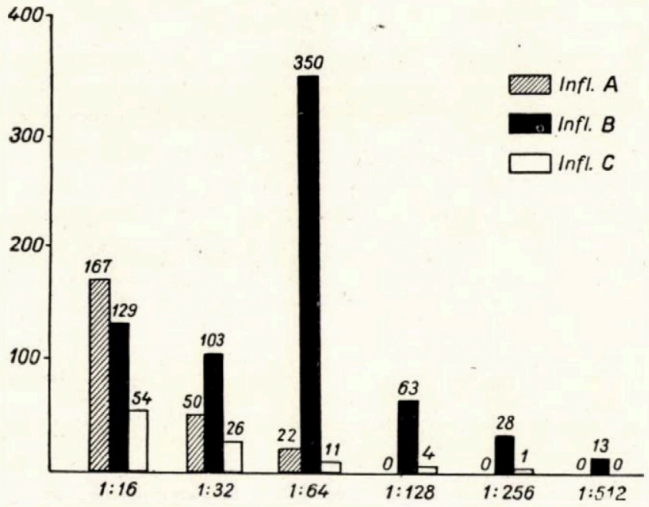


Fig. 1. Incidence of complement fixation titres of 1 : 16 or higher in 1140 adult sera. Ordinate, number of sera. Abscissa, CF titres

fixing titres ; these, however, were not high. Their relation to the influenza A-prime epidemic of March and April, 1952, will be discussed in the section dealing with the results summarized in Table VI. In the same section also the influenza C titres will be analyzed.

The distribution of titres in the sera of the 64 children with clinical influenza (Table IV) differs from that of the adult group only in the fact that titres were lower. There was no A titre higher than 1 to 16 in this group. B titres predominated also here but there were a few C titres indicative of recent exposure.

Of the 152 patients under two years of age, 140 proved to be negative (with a titre lower than 1 to 8) for influenza B and 143 for influenza C. All samples were negative for influenza A. Of the infants less than 5 months old only one (a one-month old) yielded a titre to influenza B and none to either influenza C or A. The only titre was presumably of maternal origin.

TABLE IV

Sera from children and infants with clinical influenza, grouped according to complement fixing titres to influenza A, B and C, resp.

Reciprocal titer	Child sera			Infant sera		
	A	B	C	A	B	C
$\geq$ 4	54	27	49	152	140	143
8	5	8	4	—	4	4
16	5	9	7	—	4	5
32	—	5	1	—	2	—
64	—	15	3	—	2	—

TABLE V

Rise of titres to Influenza B in pairs of sera

Age of patient	Number of pairs of sera	Rise of titre			
		1- to 2-fold		4- to 8-fold	16-fold
		Titre of first sample			
		1 : ($<$ 64)	1 : ($\geq$ 64)		
Over 2 years	65	21	21	11	12
Under 2 years	38	35	1	2	—

As to the pairs of sera, the first sample was taken either on the day of admission to the hospital, or on the next day, while the second sample was taken 10 to 15 days later. We found frequently high influenza B titres in the sera taken on the day of admission. Most of the patients with a high titre showed no further antibody response in the later course of the disease, while titres low in the beginning became considerably raised in most cases (Table V, over 2 years). No fourfold or higher increase in influenza A titre was obtained. In 7 Esztergom cases the titre to influenza C was increased.

It is noteworthy that in the age group under two years most samples showed no increased titre to influenza B. In one case confirmed by virus isolation the titre rose only two months after clinical recovery, when the child reached the age of 7 months. Similar cases have been reported in the literature [4].

In Table VI are shown the percentage distributions of the A, B and C CF titres observed in the patients and convalescents from the year 1953 (I.) and those found in samples sent in for other tests (III.). The blood samples in group III originated from various parts of the country and were sent in at a time when in that particular area the outbreak was about to end. To facilitate comparison, the results of tests made with sera obtained during the 1952 epidemic from affected and convalescent subjects (II.) and also with sera sent in for other examinations (IV.) are also shown in Table VI.

TABLE VI

Distribution of sera from different groups, according to complement fixing titres to influenza A, B and C, respectively

Reciprocal titre	Distribution according to A titre				Distribution according to B titre				Distribution according to C titre	
	I.	II.	III.	IV.	I.	II.	III.	IV.	I.	III.
≦ 8	79,1	47,0	78,4	63,4	39,7	86,4	65,4	82,5	91,5	90,2
16	14,5	17,5	15,2	22,2	11,2	9,8	14,2	10,8	4,7	6,4
32	4,4	14,4	5,2	14,0	9,2	3,8	7,9	7,0	2,3	2,6
64	2,0	12,7	1,2	0,4	30,7	—	10,9	—	1,0	0,6
128	—	3,8	—	—	5,6	—	1,2	—	0,4	0,2
256	—	3,5	—	—	2,4	—	0,2	—	0,1	—
512	—	1,1	—	—	1,2	—	0,2	—	—	—
Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

I. = 1140 patients, with influenza or convalescent, January—March, 1953.
II. = 285 patients, with influenza or convalescent, March—May, 1952.
III. = 501 blood samples sent in for syphilis serology, February—March, 1953.
IV. = 257 blood samples sent in for syphilis serology, July, 1952.

It can be seen in Table VI that in the two 1952 groups very few sera revealed a titre to influenza B and none of these exceeded 1 to 32. Without the occurrence of an intercurrent influenza B outbreak, these titres would have been further diminished. In fact, nearly 50 per cent of the sera in group I, and 20 per cent of those of group III, showed a rise in the titre to influenza B, as compared to the distribution of titres in groups II and IV. From this the conclusion was drawn that both the actually affected and the convalescent subjects, on the one hand, and the members of the control group, on the other, were exposed to influenza B infection in at least such a proportion as described above. The incidence of an increased titre was strikingly higher in group I than in group III. From this it follows that the rise of the titre to influenza B is closely connected to the actual disease.

The influenza A titre showed an entirely different distribution. The difference between group II and IV clearly shows the correlation between the rise in titre in 1952 and the influenza A-prime epidemic of that year. The titres persisting after the epidemic in the spring of 1952 became, however, further reduced, beginning from July (IV.) until the onset of the present outbreak. There is no material difference between groups I and II, i. e. the majority of the affections in the year 1953 was not accompanied by a rise in the titre to influenza A.

Nevertheless, there is still some evidence that a rise in the titre of influenza A has occurred during the 1953 epidemic. In January and February only 35

(4,4 per cent) of the 791 sera from actually sick and convalescent individuals showed an influenza A titre of 1 to 32 or higher, as comparad to 37 out of 349 (10,9 per cent) obtained in March. The difference is strongly significant.

The influenza C titre was nearly uniformly low in groups I and III. This appears to indicate that influenza C virus did hardly play a part in the 1953 cases. The incidence of influenza C titre was particularly low among the hospitalized (i. e. more serious) cases, while most of the positive sera originated from inhabitants of colleges. Still, in favour of the pathologic role of influenza C virus is the fact that in the group of subjects showing symptoms of influenza but with sera negative to both influenza A and B, two showed a titre of 1 to 128, six one of 1 to 64 and four one of 1 to 32, to influenza C.

It can be seen in Table VII, that the incidence of a high influenza C titre was more common among the 138 samples sent in from Esztergom for syphilis serology, than among blood samples sent in from other parts of the country. (Table VII).

TABLE VII

501 samples of sera sent in for syphilis serology, grouped according to titre to influenza C and area of residence

Reciprocal titre	Esztergom		Other areas of Hungary	
	No	%	No	%
≤ 8	113	81,8	339	93,4
16	15	10,9	17	4,7
32	6	4,4	7	1,9
64	3	2,2	—	—
128	1	0,7	—	—
Total	138	100,0	363	100,0

Other data, not to be detailed at present, also tend to show that among the Esztergom sera the influenza B titre was also more frequent than in the other groups. The distribution of influenza A titres in the Esztergom group was similar to that of other groups.

Discussion

It follows from the above data that in the influenza epidemic spreading over Hungary in January and February, 1953, influenza B virus was the predominant pathogenic agent. The isolation of 11 strains of influenza B virus and the serological examinations detailed above also support this view. The serological evidence obtained shows that a considerable proportion of the population was affected.

Hardly any role is attributable to the influenza A virus. There is little doubt as to the originality of the isolated strain of A-prime, since at the time of isolation we worked with no such strain in the laboratory. The value of the isolation becomes, however, much reduced by the fact that the strain showed an unusual behaviour in the first five passages, that it never appeared in the O phase and that there were no means to examine in convalescence the serum of the 10 months old baby the strain had been isolated from. An interesting feature of the case was that the infant, whose disease manifested itself with an acute onset and a prolonged course, with the clinical symptoms of influenza, could not have developed immunity to influenza A-prime virus in the previous year, in view of her age.

Another argument against the presence of any wide-spread A type infection is that in the group of subjects suffering or convalescent from influenza the occurrence of sera with a high titre was not more frequent than in the control group and that influenza A antibody was not detectable in any of the sera from 152 babies.

On the other hand, by the end of the outbreak and immediately after it, convalescent sera with titres of 1 to 32 or 1 to 64 were significantly more frequent than during the actual epidemic period. This might be due to the sporadic occurrence of a few influenza A infections, but it may also be assumed that it was an infection of some other type which has brought about a non-specific rise in the heterologous titre dating back to some previous infection. Rather in favour of the latter view is the fact that an influenza A titre higher than 1 to 64 occurred in none of the cases, although infection with influenza A is known frequently to cause a high rise in the titre (See Table VI, group II). It is, however, also true that the mentioned influenza A titres frequently occurred in such sera which yielded no titre to influenza B or C.

The occurrence of influenza C infections could be confirmed by virus isolation and by serological tests. Its role in the pathogenesis has been discussed elsewhere [3]. In the present paper new evidence has been presented in support of our view that in a small proportion of the influenza cases of the 1953 epidemic, influenza C virus was the pathogenic agent, and as such, presumably the only one.

It is interesting that CF titres indicated a higher incidence of both influenza B and influenza C infections in Esztergom, the part of the country first affected by the epidemic.

The first country-wide influenza B epidemic confirmed by virus isolation in Hungary was the one described in this paper. Small, more localized outbreaks were reported in 1949 [5] as well as in 1951 [6, 2]. As in each country-wide outbreak since 1937 the influenza A or A-prime virus had proved to be the predominant pathogenic agent, it may be stated that since 1937 no influenza B epidemic similar to the one described occurred in Hungary.

SUMMARY

1. The influenza epidemic of January and February, 1953, in Hungary was caused by a strain of influenza B virus. This strain is very similar to strain Budapest 1/49, but it is different from the Lee strain.

2. Strains influenza A and A-prime played no part in the epidemic, except for a very small number of sporadic infections. The A-prime strain isolated during the period of the outbreak originated from an infant that was borne during the A-prime epidemic in the spring of 1952. The strain belongs to the Liverpool subtype.

3. During the epidemic some cases presumably due to influenza C infection also occurred. One strain of influenza C virus could be isolated, as it had been reported elsewhere [3].

4. At least since 1937, this was the first country-wide influenza B epidemic in Hungary

LITERATURE

1. *Petrilla, A.:* Acta Microbiol. In press.
2. *Dömök I., Szafir É., Farkas E.:* Acta Microbiol. **1.** 99 (1954).
3. *Farkas E., Dömök I.:* Acta Microbiol. **1.** 85 (1954).
4. *Anderson, S. G., Donelley, M., French, E. L., Kalra, S. L., White, J.:* Med. J. Austral. **2.** 44 (1953).
5. *Farkas E., Takátsy Gy.:* Népegészségügy **30.** 402 (1949).
6. *Dömök I., Farkas E., Gál M.:* Népegészségügy 32. 449 (1951).

ЭТИОЛОГИЯ ЭПИДЕМИИ ГРИППА 1953 ГОДА В ВЕНГРИИ

Э. Фаркаш и И. Дэмэк

Резюме

Возбудителем эпидемии, протекшей повсеместно в Венгрии в январе и феврале 1953 года, оказался один штамм гриппозного вируса »B«. Штамм этот мало отличается от изолированных в Будапеште в 1949 году гриппозных штаммов типа »B«. Вышеуказанное мнение подтверждается выделением 11-ти гриппозных штаммов »B« и реакциями связывания комплемента, поставленными более чем с 2000 человеческих сывороток. Гриппозные вирусы типов A и A' не играли роли в эпидемии, встречались только единичные случаи заболеваний такого типа. За время эпидемии был изолирован один штамм гриппа »A« от грудного младенца, который естественно не мог приобретать иммунитета за время весенней эпидемии гриппа типа A' в 1952 году. Упомянутый штамм принадлежит к Ливерпульскому подтипу. В ходе процесса эпидемии отмечались заражения гриппа »C« и предписываемые, повидимому, последнему заболевания. После 1937 года, эпидемия 1953 года являлась первой повсеместной эпидемией гриппа »B« в Венгрии.

A NEW SENSITIVE METHOD OF THE ROLLING DRUM TYPE FOR INFLUENZA VIRUS TITRATION

By
S. HORVÁTH

Institute of Microbiology, University Medical School, Szeged

Received 12 November, 1953

Influenza virus which has been adapted to grow in the developing hen's egg will multiply very readily in the chorio-allantoic membrane or in other tissues suspended in a suitable fluid. The infectivity of the medium or its haemagglutination titre may serve for estimating the multiplication of virus [1, 2, 3, 4, 5].

Fulton and *Armitage* [6] have worked out a method for influenza virus titration which is based on the above principle. In their method the virus is grown in a medium consisting of physiological saline and single pieces of chorio-allantoic membrane in cups drilled into a plexiglass (plastic) tray. The multiplication of virus is assessed by the chicken red cell agglutination method. This procedure, however, is not devoid of drawbacks such as: *a)* entire chorio-allantoic membranes are not suitable for the elimination of differences between individual eggs. Conditions are not the most favourable for tissue survival, either, partly because *b)* plexiglass is not biologically neutral and for virus cultivation acid media (pH 6,8) are required, and partly because *c)* the method does not ensure optimum aeration of tissues. Another disadvantage is that the neutralisation test involved is a rather complicated procedure [7].

The method of virus titration described in the present paper has the following advantages over the procedure of *Fulton* and *Armitage*. *a)* The homogeneous tissue suspension used eliminates individual differences between eggs. *b)* The virus is grown in glass-vials and thus it is possible to select the pH most suitable for the medium, and *c)* adaptation of the rolling tube culture principle allows to provide the most favourable oxygen supply to the tissues [8]. The method is adaptable to the various purposes of influenza and ND virus research.

Apparatus and Materials

Dilution tray. A plexiglass plate, $23 \times 6{,}5 \times 1$ cm in size is drilled so as to contain 12 rows of 3 cups 1,5 cm in diameter and 0,9 cm deep, with flat bottom. A sliding indicator mounted on one side of the tray may be adjusted to show the actual dilution made. The tray is sterilized by exposure to ultraviolet light for 10 minutes. 0,9 ml of diluent is measured into each cup and the virus is diluted

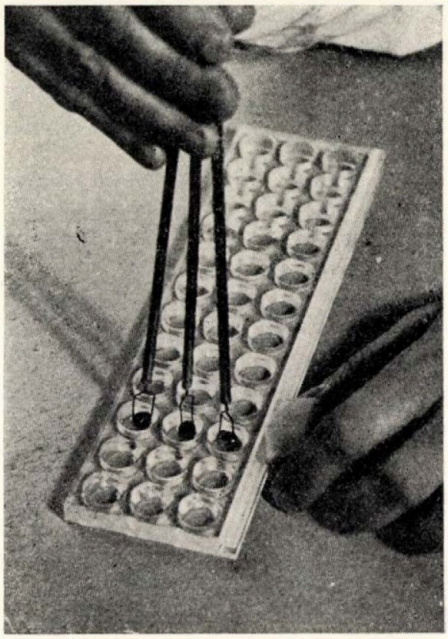


Fig. 1. Preparation of dilutions of virus on the plastic tray, using *Takátsy*'s loop

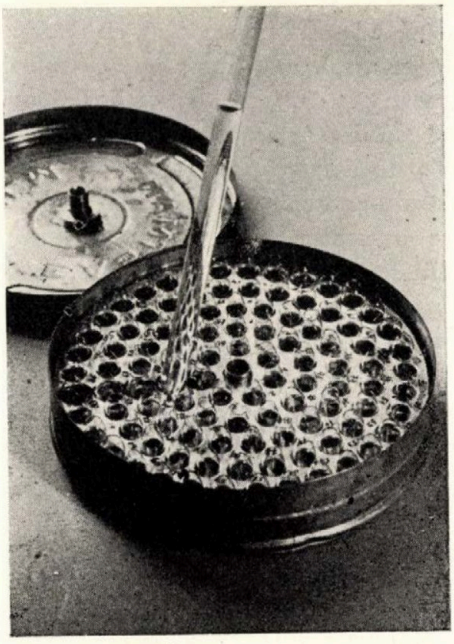


Fig. 2. Measuring of nutrient medium into ampoules in the rolling drum

by means of *Takátsy*'s spiral loop [9]. The loop is sterilized in flame and allowed to cool before every dilution (Fig. 1).

Rolling drum. This is an aluminium box provided with a lid. The drum measures 18 cm in diameter and 4 cm in depth. From the middle of the lid protrudes a shaft that fits snugly into a socket in the middle of the drum to ensure air-tight closure. Two drilled aluminium plates 2 cm from one another are placed in the drum to accomodate 103 ampoules. The holes in the upper plate are numbered. Prior to incubation the drum is closed at the side by means of a rubber band (Fig. 2).

Virus is grown in small flasks made from 2 *ml ampoules.* The mouth of each ampoule is slightly constricted over flame in order to prevent spilling of the 0,7

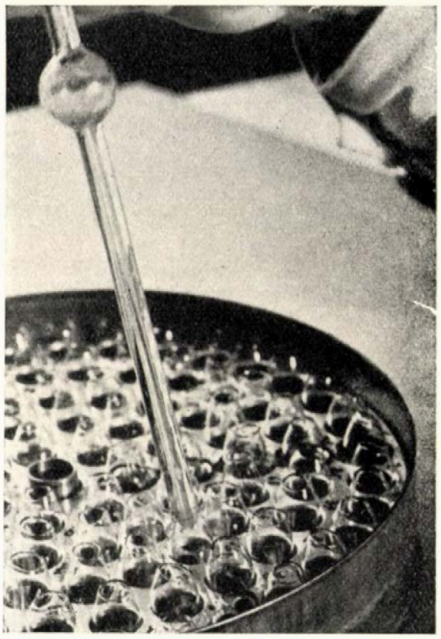


Fig. 3. Measuring of tissue suspensions into ampoules

ml of fluid contained, even when the ampoules are held in a horizontal position. The ampoules are sterilized in the drum, by exposing them to 170°C dry air for a period of 3 hours.

Tissue Suspension Pipette. The pipette used for measuring in tissue suspension has an internal diameter of 0,15 cm and is calibrated to 0,01 ml (Fig. 3).

Rotation. The drums are rotated 5 to 6 times per hour by means of a gramophone motor mounted outside of the incubator (Fig. 4).

Haemagglutinin (HA) Titration. The virus content of the fluid in the ampoules is determined by the chicken red cell agglutination method, according

to *Takátsy* [9]. Virus from six ampoules can be diluted simultaneously with the 0,025 ml *Takátsy*'s loop on the plastic tray and thus the time required by an assistant to titrate the virus content of 200 ampoules and to make the readings takes not more than 150 minutes. Each virus is diluted in 6 tubes, in double steps (Fig. 5).

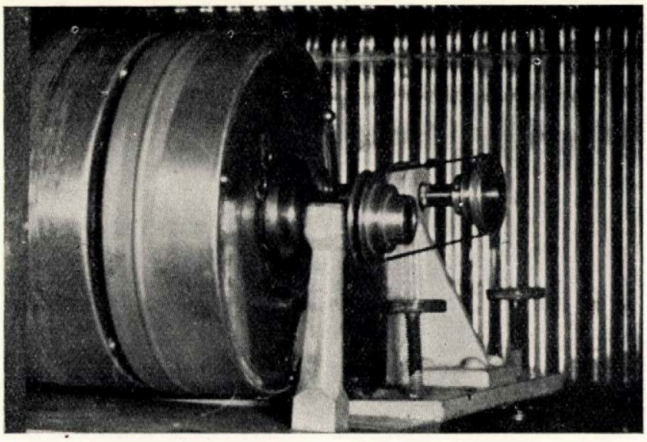


Fig. 4. Rolling of drum in the incubator

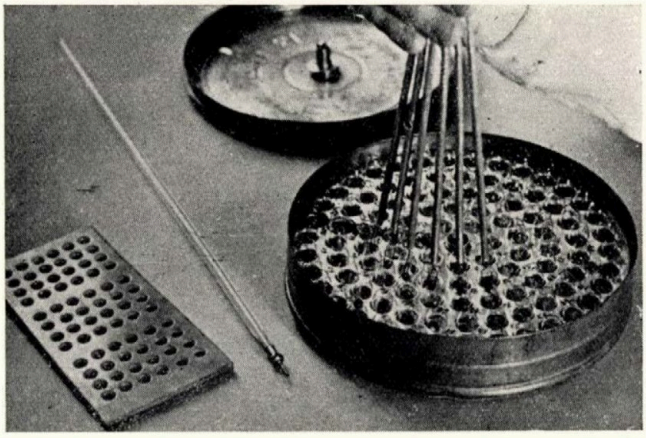


Fig. 5. Titration of fluids in the ampoules by the chicken red cell agglutination method. Beside the rolling drum are shown a dropping pipette and a titration tray

Virus Strains. Egg-adapted strains were titrated. The strains involved were PR8, Lee, A-prime England 1/51, A-prime Sweden 3/50, Weiss and Swine strains of influenza virus, as well as strain ND 26, isolated in Hungary. The mumps

virus strain of *Enders* was also used. Of influenza and ND viruses 10^5 ID50 in 0,1 ml volumes were inoculated into the allantoic sac of 11-day-old embryonated eggs. After incubating at 36°C for 48 hours the allantoic fluids were pooled and distributed into 1 ml ampoules. The ampoules were sealed and stored at —20°C until use, for periods not longer than 30 days. In the case of mumps virus 7-day-old eggs were inoculated and the allantoic fluid was harvested after 4 days of incubation at 35°C. Otherwise the procedure was identical with that described above. On storage at —20°C no substantial loss in infectivity occurred [10].

Immune Serum. Fresh allantoic fluid containing PR8 virus was inoculated intravenously into young chicks. 4 to 5 weeks following inoculation the chicks were killed by bleeding, the pooled sera were distributed into ampoules and stored at —20°C. Before beginning the experiment the sera were kept in a water-bath of 56°C for 30 minutes. Serum dilutions were made in glass tubes with *Takátsy*'s spiral loop.

Experimental

When minced chorio-allantoic membrane is placed in a test tube containing a suitable liquid medium and the tube is rolled 5 to 6 times an hour, the fine pieces of membrane will adhere to the wall of the tube even in the absence of plasma coagulate and will alternately be in and out of the medium and may thus acquire all the necessary salts and oxygen required for tissue survival. Rolling promotes the multiplication of virus, too.

Making use of this principle, a semi-micro method for titration of influenza virus has been worked out. Into each of the 2 ml ampoules 0,5 ml of nutrient medium, 0,03 ml of tissue suspension and 0,1 ml of diluted virus are measured and without sealing the ampoules the lid is placed on the drum and the box so closed is fitted on the axis revolving at a rate of 5 to 6 r. p. h. After 60 hours of rolling in an incubator of 37°C the fluid is titrated for haemagglutinins according to *Takátsy* [9]. Working with 6 loops, we could serially dilute fluids in 6 tubes simultaneously (Figs. 2, 3, 4, 5). The HA titre of the heamagglutinating fluids varied between 1 : 16 and 1 : 128 and was not much dependent on the dilution of the inoculum. In this way a haemagglutinating medium could clearly be distinguished from the non-haemagglutinating, negative ones. The value of ID50 was calculated from the positive and negative agglutination values according to *Reed* and *Muench* [11].

The titration procedure was worked out in detail for strain PR8. In each series six parallel ampoules belonged to each virus dilution. It has been found that after rolling for 50 hours the agglutination titres do not change appreciably and therefore rolling was continued for 60 hours only. Conditions most favourable for titration were determined on the following basis : *a)* in which of the

cultures of varying composition did the same virus suspension give the highest infectivity titre and *b)* what was the composition of the culture yielding the highest HA titres.

I. *The Significance of Rolling.* During rolling the pieces of tissue adhere to the wall of the ampoule at least 25—30 hours and can in consequence fully be supplied with oxygen (Fig. 6).

Daniels et al. [12] have reported that 1 g of chorio-allantoic membrane takes up approximately 250 μl of oxygen in one hour. Calculated on this basis, the approximately 2,5 to 3 g tissue suspension in the drum containing 103

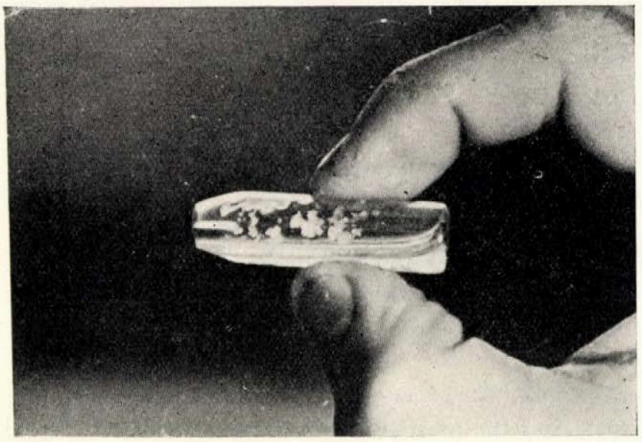


Fig. 6. Pieces of tissue adhering to the wall of an ampoule and the position of the medium during rolling

ampoules would take up 37 to 45 ml of oxygen during 60 hours. The actual amount of oxygen in the drum amply satisfies this need. When the drum was not rolled and the tubes were held in a horizontal position, the virus titre obtained was very low (ID50 $= 10^{-1.5}$) and the median of positive haemagglutination titres was 1 : 7. When rolling was continued for a period of 24 hours only and after that time the tissue suspensions were incubated with the tubes in the horizontal position, the virus infectivity titre was $10^{-6.60}$ and the median of haemagglutination titres 1 : 24. In the drum rolled for 60 hours the former value was $10^{-6.75}$ and the latter 1 : 56. It was found that rolling was important especially during the first 24 hours, while later on it hardly influenced the multiplication of virus.

II. Tissue suspension. Various tissues from 9- to 15- day-old chick embryos (Table I) were minced, thoroughly washed to remove blood, and sedimented by centrifuging at 50 g for 30 secs. Samples of the settled tissues were measured into the ampoules. The nutrient medium used in the experiments is described below.

Of the tissues studied the amniotic and allantoic membranes proved to be the most suitable, while other tissues yielded very low HA titres.

TABLE I

Multiplication of PR8 virus in different tissues

Titre	Heart	Liver	Lung	Yolk sac	Mixed minced embryo	chorio-allantoic membrane	Amniotic membrane
log ID50 per 0,1ml	$< 1{,}50$	$< 2{,}00$	6,15	6,50	6,63	6,87	7,15
HA · $\overline{M}$*	< 2	2	3	3	6	40	40

* Median of the reciprocal values of HA titres.

The age of the embryo between 9 and 15 days has no bearing on the final infectivity titre of the medium. Still, 13- to 14- day-old embryonated eggs proved to be the most suitable for supplying the chorio-allantoic membrane. The eggs were opened at the air sac with scissors, the shell membrane and the adhering part of the chorio-allantoic membrane were torn open, the embryo was removed and saved for other purposes. The membrane remaining in the shell was rinsed with physiological saline. The membranes so obtained were collected in Petri dishes containing the medium used for virus titration. The highly refractory marginal parts originally attached to the white of the egg were cut off, the membranes were washed twice in 10 ml of saline and collected in sterile dry Petri dishes. Subsequently the membranes were cut up with scissors into pieces of 2 to 6 mm^2 and transferred into a 100 ml Erlenmeyer flask, where they were washed from blood 6 to 8 times, each time in 50 ml of nutrient medium. Following the last washing the tissue suspension was centrifuged at 50 g for 30 secs. The supernatant was pipetted off, and the tissue suspension remaining at the bottom of the tube was distributed into ampoules in volumes of 0,03 ml. This volume was chosen because it had been found that on raising the amount of tissue over 0,02 ml neither the infectivity, nor the agglutination titre increased appreciably. The tissue suspension should be used within a few hours following preparation, since it has been found that after storing at 4°C for 1 or 2 days even non-minced membranes yield lower infectivity, and agglutination titres than do fresh membranes.

When membranes in one piece were used for titration not only individual variations were more marked, but also the infectivity and agglutination titres were generally lower. Cutting up the membranes eliminated individual differences between eggs, since, considering that 20 to 30 pieces of membrane are placed in one ampoule, when e. g. 220 ampoules are used, the material in them originates from 10 to 11 pieces of 14-day-old eggs.

III. Buffer Solution. The medium in the ampoules could be best buffered with a phosphate buffer of pH 7,17. When pH 6,8 was used, as suggested by *Fulton*, both the infectivity and agglutination titres were lower (Table II).

TABLE II

Determination of the pH most favourable for the multiplication of PR8 virus
(Medians of ten parallels)

Medium	Fulton's solution pH 6,8	Glucosol with 40 per cent buffer							
		pH 6,47	pH 6,64	pH 6,81	pH 6,98	pH 7,17	pH 7,35	pH 7,73	pH 8,04
log ID50/0,1 ml	6,85	6,65	6,85	6,78	7,00	7,44	6,91	7,00	6,78
HA · $\overline{M}$*	32	14	14	16	32	56	48	56	16

* Median of the reciprocal values of HA titres.

It was found that of the pH 7,17 M/15 phosphate buffer it is best to add 30 to 50 per cent (Table III) to the medium.

TABLE III

Determination of the optimum amount of buffer in the case of PR8 virus
(pH 7,17)

Buffer per cent	70	50	30	20	10	0
log ID50/0,1 ml	6,25	6,50	6,50	6,50	6,25	$< 4{,}50$
HA · $\overline{M}$*	40	48	56	28	7	< 2

* Median of the reciprocal values of HA titres.

IV. Optimum Composition of Glucosol and preparation of medium. The glucosol in the medium was made up from NaCl, $CaCl_2$, $MgCl_2 \cdot 6\,H_2O$ and glucose. In Table IV the data in the double-line column show the optimal composition. In further experiments this composition of glucosol was used, to each ml of which 16,6 units (10 μg) of penicillin and 10 μg of streptomycin were added.

It was found to be advantageous to prepare concentrated solutions of the following components of the nutrient medium for storage in sealed ampoules.

Glucosol. NaCl, 14 g; $CaCl_2$, 0,4 g; $MgCl_2 \cdot 6\,H_2O$, 1 g; glucose, 2 g; made up with glass-distilled water to 100 ml. Ampouled in volumes of 8 ml. Sterilized at 105°C for 30 min. Prior to use, 7,5 ml of glucosol is made up to 150 ml with sterile glass-distilled water.

Phosphate buffer (pH 7,17). KH_2PO_4, 2,7234 g; $Na_2HPO_4 \cdot 2\,H_2O$, 8,3132 g; made up to 100 ml with glassdistilled water. Ampouled in volumes of 10,5 ml, sterilized at 105°C for 30 minutes. Prior to use, to every 10 ml of the

TABLE IV

Determination of the optimum composition of glucosol. The medium contains 40 per cent pH 7,17 buffer solution

NaCl	‰	—	8	7	6	5	4	—
	log ID50/0,1 ml	—	7,25	7,40	7,25	7,25	6,84	—
	HA · $\overline{M}$*	—	28	56	56	48	48	—
$CaCl_2$	‰	1	0,6	0,2	0	—	—	—
	log ID50/0,1 ml	7,00	7,50	7,35	7,63	—	—	—
	HA · $\overline{M}$*	24	56	48	28	—	—	—
$CaCl_2$	‰	—	—	0,2	0,1	0,05	0,02	0
	log ID50/0,1 ml	—	—	7,76	7,50	7,40	7,60	7,31
	HA · $\overline{M}$*	—	—	32	48	24	14	24
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	‰	3	1	0,5	0	—	—	—
	log ID50/0,1 ml	7,25	7,50	7,30	7,00	—	—	—
	HA · $\overline{M}$*	40	52	56	56	—	—	—
Glucose	‰	6	3	1	0,5	0	—	—
	log ID50/0,1 ml	6,15	6,36	6,50	6,31	6,15	—	—
	HA · $\overline{M}$*	12	14	56	28	30	—	—

* Median of the reciprocal values of HA titres.

buffer 2,5 ml of penicillin and 2,5 ml of streptomycin solutions are added and made up to 100 ml with sterile distilled water.

The solutions so prepared proved to be equivalent with freshly prepared solutions even after storage at room temperature for as long as 7 months.

Penicillin and streptomycin solutions. 10 mg of penicillin are dissolved in 10 ml of sterile distilled water. 10 mg of streptomycin are dissolved in 10 ml of sterile distilled water.

On comparing this nutrient medium to other physiological solutions it was found that as regards infectivity and agglutination titres, *Gey*'s [13] and *Hanks*' [14] solutions are nearest to it (Table V).

TABLE V

Titration of a PR8 allantoic fluid in different media

	Broth	Earle	Phys. NaCl + 40% buffer of pH 7,17	Tyrode	Simms x_6 30% U. F.**	Simms x_6	Fulton	Gey	Hanks	Natrient medium
logID50/0,1 ml	< 3,50	< 4,50	4,45	6,60	6,60	6,75	6,87	7,00	7,00	7,25
HA · $\overline{M}$*	< 2	< 2	2	28	28	56	28	28	40	40

* Median of the reciprocal values of HA titres.
** U. F. = ultrafiltrate.

The salt solution containing 1 per cent egg white, used for diluting the virus, was composed of the following stock solutions.

NaCl solution. NaCl, 20 g ; made up to 100 ml with glass-distilled water. Ampouled in volumes of 5 ml. Sterilized at 105°C for 30 minutes. Prior to use, 4 ml of the solution are made up to 100 ml with sterile distilled water.

10 per cent egg white solution. To egg white collected with sterile precautions such amounts of sterile physiological sodium chloride solution are added that a 10 per cent solution should result. After allowing the mixture to stand for 1 hour, it is centrifuged at 800 g for 10 minutes and the supernatant is removed under sterile conditions. The solution may be used for 4 to 6 weeks when stored at 4°C.

For making the virus dilutions, the 10 per cent solution of egg white is diluted with sterile physiological saline to make a 1 per cent solution. Variation between 0,3 and 3 per cent in the protein content of the diluent has no bearing on infectivity or HA titres and within these limits the HA could be read distinctly.

V. Titration of various Influenza Virus Strains and of NDV. The titration method described in this paper is suitable for titrating both influenza and ND virus strains. The ID50 titres varied between $10^{-6.6}$ and 10^{-8}. The HA titres alone sufficed for undoubtedly demonstrating the presence of virus (1 : 16 to 1 : 128). Parallel *in ovo* titrations (6 eggs for each dilution) yielded only immaterially higher values, as compared to those obtained by other methods. In the case of PR8 virus the titration *in ovo* was 4,8 times more sensitive than the rolling drum method, and the corresponding figures for Lee and ND virus were 6,3 and 15,5, respectively, while the virus titration method of *Fulton* was 42 times less sensitive than the egg method [6]. Our method was, however, found to be unsuitable for titrating mumps virus (Table VI).

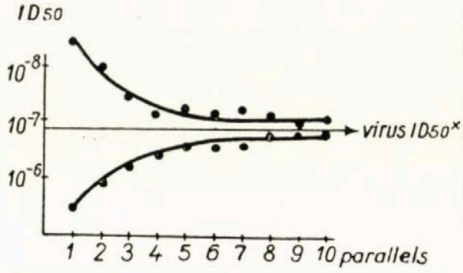
TABLE VI

Titration of different viruses

Method	Titre	Influenza						Mumps (Enders)	ND 26
		PR8	Lee	England 1/15	Sweden 3/50	Weiss	Swine		
Rolling drum	log ID50/0,1 ml	6,92	6,60	7,00	7,25	8,00	7,40	< 1,50	7,58
	HA · $\bar{M}$*	56	14	14	14	56	28	< 2	28
In ovo	log ID50/0,1 ml	7,60	7,40	—	—	—	—	—	8,77

* Median of the reciprocal values of HA titres.

VI. Variability of Results. In order to establish the deviations obtained with different numbers of parallel titrations, dilutions of the PR8 virus were measured into 45 ampoules. From the values obtained in this experiment with 45 parallels the limiting values of the figures for ID50 calculated from 1 to 10 parallels could be illustrated as shown in Fig 7. It can be noted that the highest difference in 5 to 6 parallel virus titrations amounted to $\pm 0{,}2$ to $\pm 0{,}3$ log units.



Virus dilution	titration in roller drum
10^{-4}	45/45
10^{-5}	45/45
10^{-6}	44/45
10^{-7}	20/45
10^{-8}	2/45
ID50	$10^{-6.92}$

Fig. 7. Limiting ID50 values in PR8 virus titration, calculated with 1 to 10 parallels

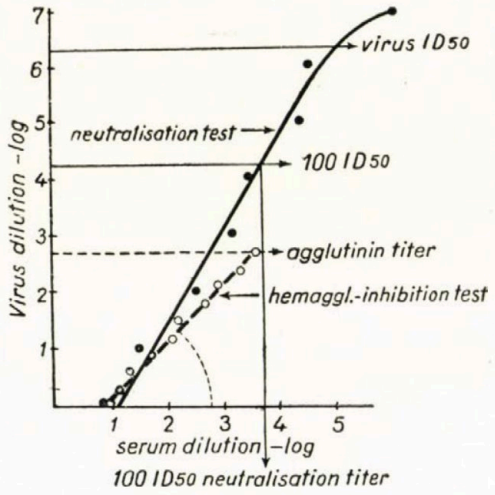


Fig. 8. Neutralization and haemagglutination-inhibition tests conducted with PR8 virus

VII. Virus Neutralization Test. The method can be applied also to neutralization tests. To dilutions of inactivated serum volumes of different virus dilutions were added and the serum/virus mixture was kept in a water bath of 37°C for 1 hour. Subsequently the ampoules were inoculated with the mixture, and rolled for 60 hours in an incubator of 37°C. Then the virus content of the ampoules was estimated by the chicken red cell agglutination method and the

50 per cent protection of the serum for different virus dilutions was calculated on this basis. Graphically, the neutralization titres formed a steep line slightly curving at the top, while the HA-inhibition titres gave a direct line with a slope of 45° [15] (Fig. 8).

The deviation between the angles of inclination of the two lines shows, too, that the processes of neutralization and haemagglutination-inhibition do not take an exactly identical course.

According to our experience, the following method is recommendable for carrying out the neutralization test. The infectivity titre of the virus should be determined and, simultaneously, to two rows of serum dilution measured amounts of two viral suspensions should be added, one containing more, and the other less, than 100 ID50. In this case one should have to reckon out three dilutions only; one would be the dilution containing virus at a concentration of ID50 and the others the serum dilutions affording 50 per cent protections. If the point of intersection of the line representing the protection values with that representing 100 ID50 is projected onto the line of serum dilution, the serum dilution offering a 50 per cent protection against 100 ID50 is obtained. Calculating the neutralization titre in this way eliminates the error which is bound to arise when the value of ID50 is determined not in the same experiment.

Discussion

In order to titrate influenza virus with any reasonable degree of accuracy, a large number of parallels must be set up, meaning a rather costly and laborous procedure. In virus infectivity titration, even the most careful sampling may fail to eliminate the error due to individual differences between eggs. In the rolling drum method finely minced chorio-allantoic membranes are used and thus individual differences become eliminated. To support this statement it is mentioned that during the 18 months this method has been used it never occurred that in ampoules, inoculated with virus in a concentration higher than that producing virus multiplication in all six parallels, no virus multiplication could be demonstrated which, on the other hand, is not an unusual occurrence in titrations *in ovo*.

Virus multiplication appeared to be optimal in the pH range from 7,2 to 7,3. In acid (pH 6,8) medium not only the infectivity, but also the HA titres were found to be lower. Virus titrations were carried out also in 25 ml Erlenmeyer flasks, as well as in plexiglass dishes similar in size, maintaining different pH values in them. The pH values at which the highest rate of virus multiplication was observed were between 7,2 and 7,5 for glass dishes and pH 6,7 for plexiglass ones, irrespective of the fact that the chorio-allantoic membranes used were left in one piece or were finely minced. These experimental findings permitted the conclusion that plexiglass cannot be considered as biologically neutral and should be employed in experiments of this kind only with precaution.

The small amounts of penicillin and streptomycin added to the medium suffice completely to eliminate bacterial contamination from the air. In our series infection by moulds was a most rare occurrence, while it is known that such contamination is not at all infrequent in titrations carried out in plexiglass dishes. Nevertheless, such contaminations hardly influenced the evaluation of our experiments.

The practicability of this method of titration is shown by the fact that the time required for setting up a series involving several hundred tubes is shorter than that required for testing on a similar scale *in ovo*. Also, after completion of incubation there are no eggs to be opened and no allantoic fluids to be pooled, since the media may be titrated, six at a time, directly from the ampoules.

On the strength of its exactness and sensitivity, this method of titration may be readily adapted to research work on viricidal substances. The method of choice for demonstrating virus in such experiments has been the haemagglutination test which, however, is unsuitable for the demonstration of small amounts of virus.

The advantages of the method described may be summarized as follows.

1. The chorio-allantoic membrane of a single 14-day-old embryonated egg may be distributed into 20 to 25 ampoules. At the same time, the embryo may be used for other purposes. Thus, large amounts of eggs may be saved.

2. The use of homogeneous tissue suspension makes it possible to eliminate differences between individual eggs and to titrate with greater accuracy with the same number of parallels, than *in ovo*.

3. Tbe procedure is adaptable to virus titration, to a technically simple neutralization test and to the purposes of research on viricidal substances.

4. Titration can be carried out at low cost easily and with a high degree of accuracy.

LITERATURE

1. *Pearson, H. E.* and *Enders, J. F.:* Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. **48.** 140 (1941)
2. *Bernkopf, H.:* Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. **72.** 680 (1949).
3. *Stulberg, C. S.* and *Schapira, R.:* J. Immun. **70.** 51 (1953).
4. *Weller, T. H.* and *Enders, J. F.:* Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. **69.** 124 (1948).
5. Закстельская, Л. Я., Ритова, В. В.: Журнал Микробиол., эпинемиол. и иммунбиол. **8.** 54 (1953).
6. *Fulton, F.* and *Armitage, P.:* J. Hyg. **49.** 247 (1951).
7. *Fulton, F.:* J. Hyg. **50.** 265 (1952).
8. *Carrel, A.:* Klin. Wchschr. **50.** 1097 (1913).
9. *Takátsy, Gy.:* Kísérletes Orvostudomány **4.** 60 (1952).
10. *Olitsky, P. K., Casals, J., Walker, D. L.* and *Ginsberg, H. S.:* J. Lab. Clin. Med. **34.** 1023 (1949).
11. *Reed, L. J.* and *Muench, H.:* Am. J. Hyg. **27.** 493 (1938).
12. *Daniels, J. B., Eaton, M. D.* and *Perry, M. E.:* J. Immun. **69.** 321 (1952).
13. *Gey, G. O.* and *Gey, M. K.:* Am. J. Cancer. **27.** 45 (1936).
14. *Hanks, J. H.:* J. Cell. and Comp. Physiol. **31.** 235 (1948).
15. *Walker, D. L.* and *Horsfall, F. L. Jr.:* J. Exp. Med. **91.** 65 (1950).

НОВЫЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ МЕТОД ТИТРОВАНИЯ ГРИППОЗНОГО ВИРУСА В ПОВОРОТНОМ БАРАБАНЕ

И. Хорват

Р е з ю м е

Описываем простой, дешевый и точный метод титрования гриппозных вирусов и вируса Н. Д. Размельченную на кусочки хориоаллантоидную мембрану кладем в содержащие соответствующую питательную жидкость ампулы, которые помещаем в поворотный барабан. При вращении барабана кусочки ткани прилипают к стенкам ампул и таким образом могут себе обеспечить оптимальную потребность в кислороде и в то же время из питательной среды получают необходимые вещества. Размельчением мембран исключается индивидуальная разница, имеющаяся между яйцами, и таким образом титрование становится более чувствительным и точным. Описанный метод применим для титрования вируса, нейтрализирующих доз и для исследования вироцидных веществ.

A NEW AND SENSITIVE METHOD OF PHAGE TITRATION ON PLASTIC TRAYS

By
S. HORVÁTH and L. ALFÖLDI

Institute of Microbiology, University Medical School, Szeged

Received November 12, 1953

Suspensions of phage may be titrated for phage content either in liquid, or in solid media. In liquid media the lysis produced, in solid media the number of distinctly visible plaques serve as the basis for assessing phage counts.

In general, titration on solid media has been given preference over methods involving the use of liquid media, owing to the higher degree of accuracy obtainable by the former method. Liquid media are used for special purposes only and even then in conjunction with some solid medium. For instance, *Fisher* and *Gorelova* assay the clinical efficacy of dysentery bacteriophage by such a combined method [1].

For counting phage particles on a solid medium, a suitable susceptible bacterium and an agar medium of proper concentration are added to dilutions of the phage. After mixing, the bacterium/phage suspension is either poured or is pipetted on an agar medium contained in Petri dishes [2, 3].

The method of *Jones* and *Krueger* [4] is more simple and yields more exact results. The phage/bacterium mixture containing agar medium is pipetted onto slides and after it has solidified the slides are incubated at 37°C in a Petri dish containing wet cotton wool.

The most important source of error in the titration methods hitherto used is that on plating out or measuring out the semisolid agar, more or less of the medium remains in the original vessel, depending on the temperature of the glassware employed and on the concentration of agar. Most of the current methods involve the use of great amounts of medium and of glassware, rendering it difficult to set up many parallels.

In order to eliminate the above difficulties, efforts were made to elaborate a method of phage titration which would allow the worker to set up a large number of parallels without assistance, within a short time, rapidly, with a reasonable degree of accuracy and with a relatively small amount of materials.

A variety of circumstances may influence the titration of phages. The result depends on the age and dilution of the bacterium culture, on the concentration of the agar, on the layer thickness of the plated medium, on the temperature of incubation, on the relations of phage absorption, on humidity, etc.

For this reason it was attempted to determine the most favourable conditions for obtaining the highest phage count. This new method of titration differs from orthodox methods in many points (6).

Apparatus and Material

Dilution tray. Phage was diluted in cups drilled into plexiglass trays, $23 \times 6{,}5 \times 1$ cm in size. Each tray contains 12 rows of 3 cups each, the cups being flat-bottomed and measuring 1,5 cm in diameter and 0,9 cm in depth. A sliding indicator mounted on one side of the tray may be adjusted as to point at the

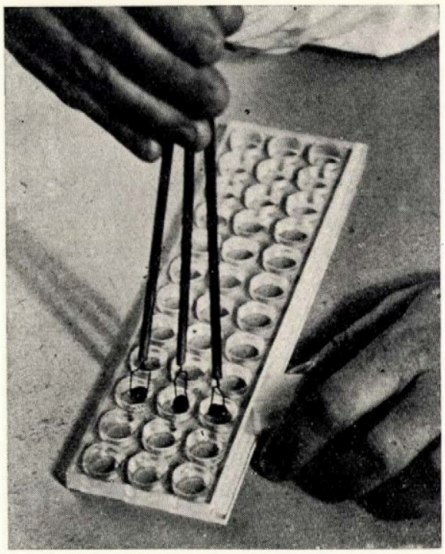


Fig. 1. Diluting the phage suspension on the dilution tray

actual dilution attained. The suspending fluid is measured into the cups in 0,9 ml volumes and the phage is diluted with the aid of *Takátsy*'s loop [5] holding 0,1 ml, so that after each step the loop is sterilized in a flame and allowed to cool (Fig. 1).

Titration plate. Instead of Petri dishes titration plates $12 \times 22{,}5 \times 0{,}5$ cm in size were used, into which 15 deepenings forming flat-bottomed cups, 3,5 cm in diameter and 3 mm deep were drilled.

Humid chamber. The bacterium/phage cultures are incubated in the cups of the titration plates at 37°C. A humid chamber, 15 cm wide, 20 cm high and 26 cm long, provided with a door opening downwards was constructed to accommodate the plates with a distance of 1,5 cm between each two. To ensure the humidity required a dish at the bottom of the chamber may be filled with water (Fig. 2).

The humid chamber is placed in an incubator.

Counting apparatus. Following incubation the plaques produced are counted with the aid of a special apparatus, in dispersed light (Fig. 3, 4). The magnifying lens in the apparatus, movable in every direction and also fixable, was provided on its superior surface with a network of squares.

Bacterium and phage. The strains used were Ps. pyocyanea (isolated by us) and Sh. flexneri II. (Sh. Fl. II.).

The phages were isolated from sewage and purified. Two phages for Ps. pyocyanea were isolated. One of them, designated with letter »a«, grew in

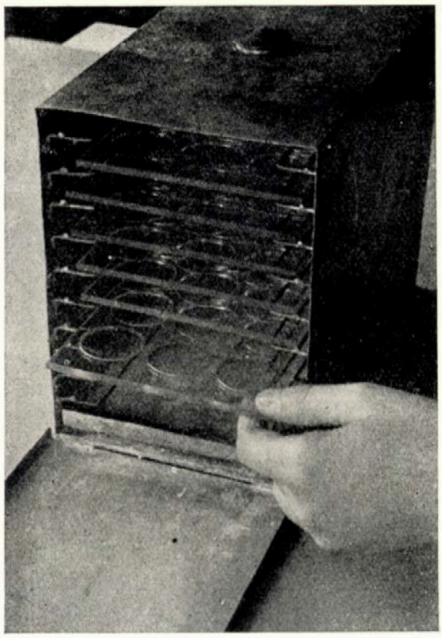


Fig. 2. Position of titration plates in the humid chamber

small plaques, while the other, designated »b«, formed large plaques. The phages cultured in a liquid medium were passed through a Seitz filter to eliminate bacteria and the filtrate was ampouled and stored at −20°C. The suspensions of phage in actual use were kept at +4°C.

A suitable indicator bacterium strain was isolated for the detection of a phage produced by a lysogenic strain of Ps. pyocyanea and the method was adapted also to this phage.

Technique of Titration

Titration may be carried out in two ways. Phages growing rapidly and forming large plaques may be titrated without being plated out on agar, while

phages showing a poor growth should be seeded onto the surface of an agar plate of a certain thickness.

1. When no agar basis is used, carefully made dilutions of phage are distributed in 0,2 ml volumes to the left side of the cups in the titration plate

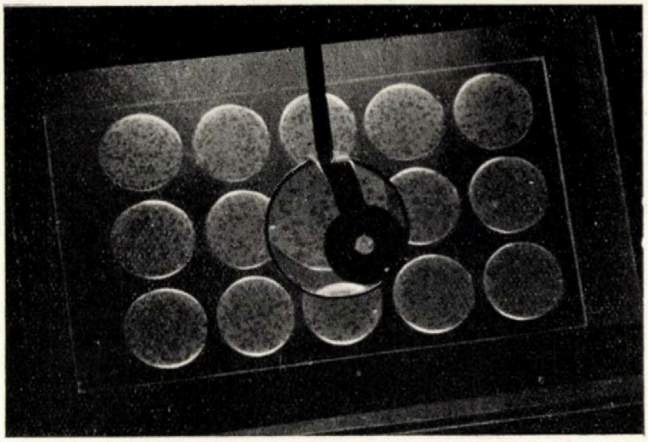


Fig. 3. Position of titration plate under the counter apparatus

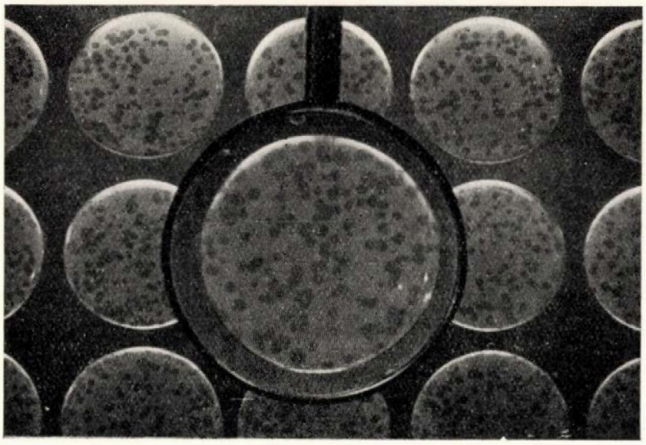


Fig. 4. The plaques may be accurately counted under the screened magnifying lens

by means of a pointed 1 ml pipette. An exact measurement of the volume is of paramount importance. Onto the other side of the titration cups 0,1 ml volumes of the optimum dilution of the bacterium are measured (Fig. 5). The plate is then kept in circular movement for 30 seconds to mix the two suspensions in the cups and, subsequently, for being able to measure the agar medium into the 15 cups in time, placed on a metal plate heated to 40 to 45°C, in order to

prevent coagulation of agar before time. The plates may be heated also on sterilizing boxes of larger size. Into the middle of the cups of the titration plates volumes of 1 ml are measured of a preheated semisolid medium adjusted to an optimal agar concentration. The semisolid medium should be preheated to 45 to 50°C. Then the agar medium measured into the 15 cups is mixed by stirring with the bacterium/phage mixture, the titration plates are placed on a level glass plate for 3 to 5 minutes. After the agar has become solid, the plates are placed in a humid chamber (Fig. 2) for incubating for adequate lengths of time. If 10 titration plates are used simultaneously (150 cups), no extra water is needed in the humid chamber. After incubation the trays are taken out of the chamber

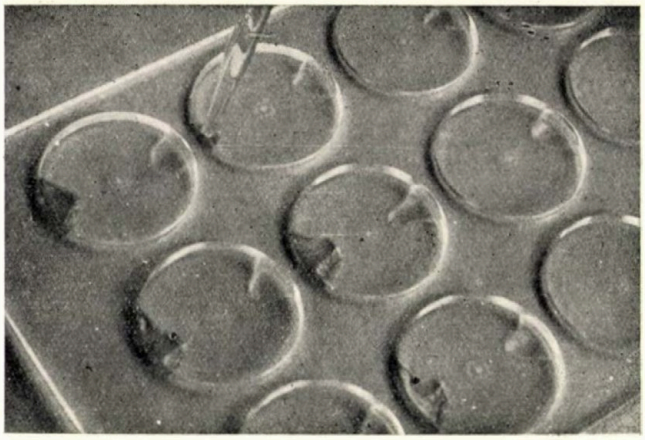


Fig. 5. Measuring of phage and bacterium suspensions into the cups of the titration plate

and if the purpose is to obtain information about the state at completion of the incubation, 0,2 ml of a saline solution containing 2 per cent formaldehyde are measured in each cup. In an environment of adequate humidity the material in the cups so treated will keep unchanged for as long as several days. In a single cup 200 equally distributed plaques 2 mm in diameter each may be easily and accurately counted (Figs 3 and 4).

The number of phage particles per ml is calculated from the values obtained in parallel cups which show the highest but still easily countable number of plaques.

The titration plates are disinfected in tap water containing 5 per cent formaldehyde. Washing the trays offers no major difficulty, as under tap water the agar falls out of the cups in one piece. After drying with a soft cloth, the plates are again ready for use. Dilution trays are disinfected and cleansed in the same way.

2. For titrating poorly growing phages 2 ml of the medium containing 1 per cent agar is poured into each cup and the bacterium phage mixture, suspended in dilute agar, is pipetted onto the surface of the plates.

The latter method was employed for titrating the phage produced by the lysogenic strain of Ps. pyocyanea. Into each cup 2 ml of a synthetic medium containing 1 per cent agar were measured. The phage was diluted in test tubes, by means of *Takátsy*'s loop and to each tube a known amount of the suitably diluted indicator bacterium strain was added and subsequently such an amount of agar that a final agar concentration of 0,2 per cent should result. From this dilute bacterium phage suspension 0,2 ml volumes were seeded on the surface

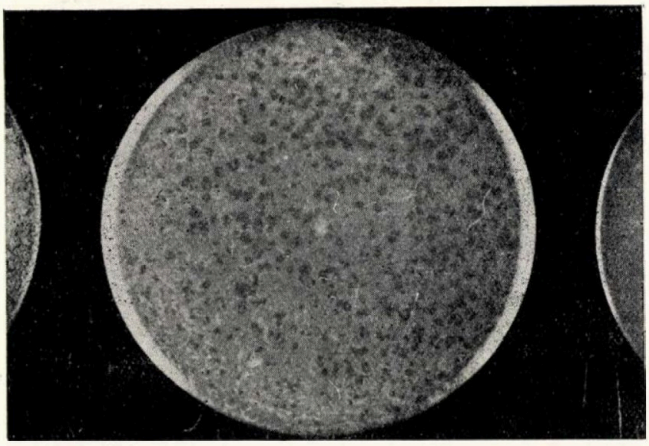


Fig. 6. Phage produced by a lysogenic strain of Ps. pyocyanea

of the agar plate. The result was read after 20 hours of incubation at 37°C. By that time the phage plaques developed (Fig. 6) into a size allowing easy counting.

Experimental

The factors influencing phage titre were studied one by one and the optimum conditions for each factor were determined partly on the basis of the phage count and partly on that of changes in the size of the plaques. It was found that in most instances the appearance of larger plaques was associated with a higher phage count. Since it took a long time to determine the diameter of phage colonies by means of an ocular micrometer, the material was treated with an aqueous formaldehyde solution in order to fix the actual state at the end of incubation.

The following experiments show the influence of different factors on plaque count and plaque area.

(i) *Age of bacteria.* In order to increase their number, bacteria were seeded on agar and the colonies which had grown on the surface were washed off with 5 ml of broth. Broth suspensions of Sh. Fl. II. grown at 37°C were prepared by the above method in the 5th, 10th, 15th, 20th, 25th and 30th hours and, under the control of a turbidimeter, each solution was adjusted to the turbidity of the youngest culture. Dilutions 1 : 1, 1 : 8, 1 : 12 and 1 : 16 of these suspensions were then measured in 3 parallel cups each. To each cup 0,2 ml of the phage suspension diluted to 4.10^{-5} was added. This phage dilution gave a phage count of about 70 to 100. The trays were heated and into each cup 1 ml of 0,65 per cent

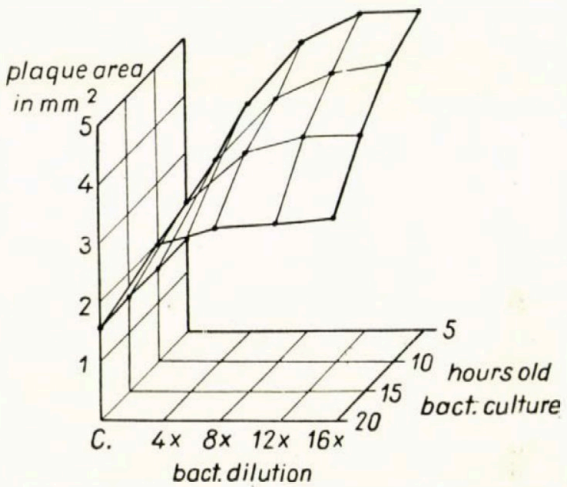


Fig. 7. Changes in the size of phage area for Sh. Fl. II. phage, propagated on bacterium cultures of varying age. Reading after 5 hours of incubation
C, undiluted bacterial suspension

agar of 50°C was measured, so that the final concentration of agar was 0,5 per cent. After 5 hours of incubation the diameter of 30 plaques, selected at random, were measured. Having worked with 3 parallel cups, the average of 90 diameters was used for calculating the average plaque area, this being a more accurate indicator of individual differences than the diameters. The values of plaque area are shown in the graphs.

The highest number of phage plaques was encountered with eightfold and twelvefold bacterium dilutions. The 5 and 25 hour bacterium cultures showed noticeable differences. Young cultures produced more plaques than those incubated for 25 to 30 hours. The highest phage count for the 5 hour culture was 84, while that for the 25 hour culture, 65. As it can be seen in Fig. 7., the greatest differences in plaque area at various dilutions could be noted in the case of the 5 hour bacterium culture. With older cultures the differences became less and less marked. The younger the bacterium cultures, the higher the phage counts

obtained. Since 5 and 6 hour bacterium cultures yielded only a small number of bacteria, 10 to 14 hour cultures were used for titration.

Similar results were obtained with Ps. pyocyanea. Thus, for further work 12 to 16 hour bacterium cultures proved to be the most suitable.

(ii) *Dilution of bacterial cultures.* 13 hour slant agar cultures of Sh. Fl. II. were washed off with 5 ml broth for making bacterium dilutions of which also the density was determined. Of the 4.10^{-5} dilution of phage suspension 0,2 ml

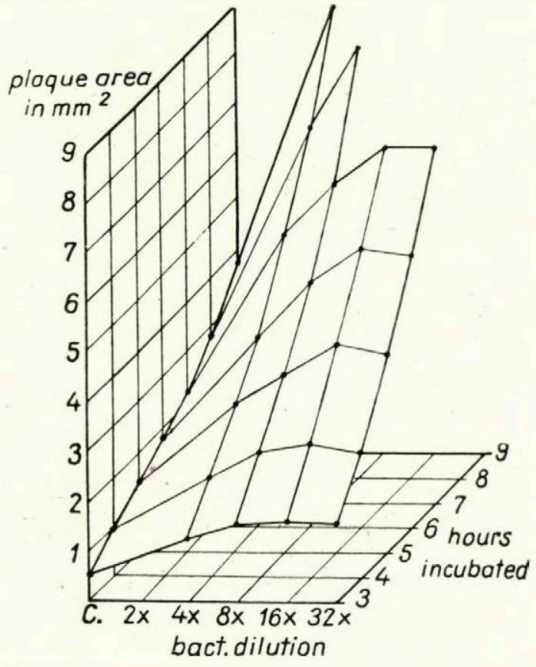


Fig. 8. Changes in the size of phage area for Sh. Fl. II. phage, at different bacterial dilutions C, undiluted bacterial suspension

were measured into each cup and the proper bacterium dilution as well as 0,65 per cent agar were added. The titration plates were then incubated for various lengths of time. As soon as after 3 hours phage plaques began to appear, whose size depended distinctly on the bacterium dilution. Eightfold to sixteenfold bacterium dilutions yielded larger plaque areas and higher phage counts than undiluted bacterium suspensions. With 100 to 500-fold bacterium dilutions not only the plaque area, but also the plaque count was substantially reduced (Fig. 8).

Similar results were obtained with the »a« and »b« phages of Ps. pyocyanea. The two types of phage differed only in that the »a« phage showed only a slight increase in plaque area even in the advanced stage of incubation. None of the two

types differed appreciably in phage count up to a bacterium dilution of 1 : 32, but the difference became marked at bacterium dilutions of 1 : 500 and 1 : 1000.

TABLE I

Effect of various bacterial dilutions on the plaque count at 37°C

Dilution of bacterium	Phage		
	»a«	»b«	Sh. Fl. II.
Undiluted	127*	98*	87*
1 : 4	119	92	97
1 : 8	127	90	93
1 : 16	107	92	85
1 : 32	135	91	76

Reading made after 6 hours

* = averages of 3 parallel cups.

On the basis of the experimental findings, a fourfold dilution of Sh. Fl. II. (living bacterium count, 8.10^8/ml) and a fourfold or fivefold dilution of Ps. pyocyanea (living bacterium count 1.10^9/ml) were used in the further studies. The data in Table I show that even wide variations in the bacterium count have little bearing on the phage count so that the experimental results are not much affected if the bacterium dose of 0,1 ml. has been inaccurately measured.

(iii) *Agar concentration.* In order to find the optimum concentration of agar, different concentrations have been tested for size and number of phage colonies. In the case of Sh. Fl. II. and »b« phage, the phage plaques showed rapid growth in agar of low concentration, while in agar of higher concentration the number and size of colonies showed only a slow rate of increase. The phage counts obtained after 5 hours of incubation in various concentrations of agar are shown in Table II.

TABLE II

Effect of agar concentration on plaque count

Agar concentration per cent	Phage		
	»a«	»b«	Sh. Flexneri II
0,3	38*	confluent colonies	82*
0,6	25	27*	79
0,9	17	31	73
1,2	13	24	72
1,3	9	21	69

Readings made after 5 hours.

* = Averages of 3 parallel cups.

In the case of Sh. Fl. II the maximum phage count in 0,3 per cent agar was attained as soon as in the third hour, while at an agar concentration of 1,5 per cent only 71 plaques could be detected as late as in the 7th hour. The optimum

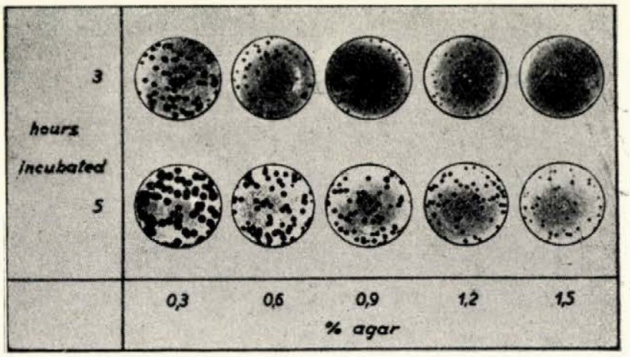


Fig. 9. Changes of Sh. Fl. II. phage at different agar concentrations, after propagation for 3 and 5 hours

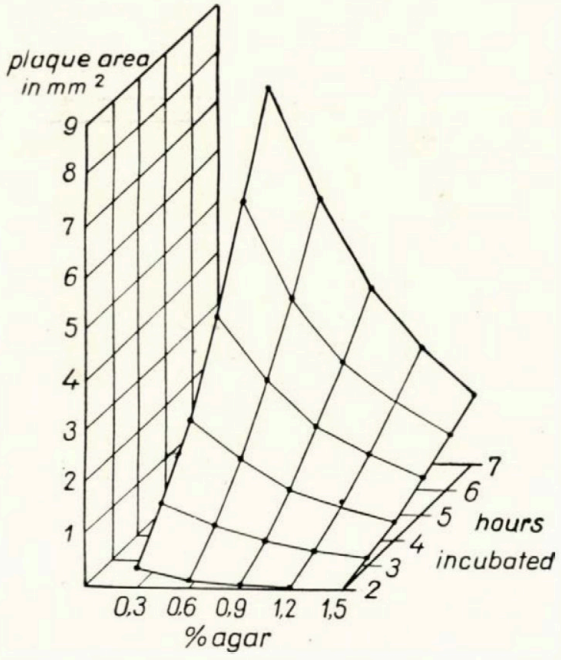


Fig. 10. Changes in the size of phage area for phage Sh. Fl. II. at different agar concentrations

concentration for experimental purposes was 0,5 per cent agar in the case of both Sh. Fl. II and phage »a«, and in the case of phage »b« it was a final concentration of 0,7 per cent.

With the advance of incubation the plaque areas of the three strains of phage showed remarkable differences (Figs. 9, 10, 11, 12). For instance, at an agar concentration of 0,3 per cent and after 6 hours of incubation the plaque area of phage »b« was 34,4 mm², that of Sh. Fl. II. phage 5,6 mm² ; and that of phage »a« was 1,02 mm².

(iv) *Thickness of agar.* The 1,3 ml of medium measured into the cups give a layer thickness of 1,35 mm. The phage count was determined in agar layers 1,04 to 2,40 mm thick, after 7 hours of incubation. In the case of Sh. Fl. II. phage, the phage counts were considerably lower at layer thickness of 2,0 and 2,4 mm than at others. In media containing a thick agar layer confluence of phage plaques was more frequent than in cups containing less medium.

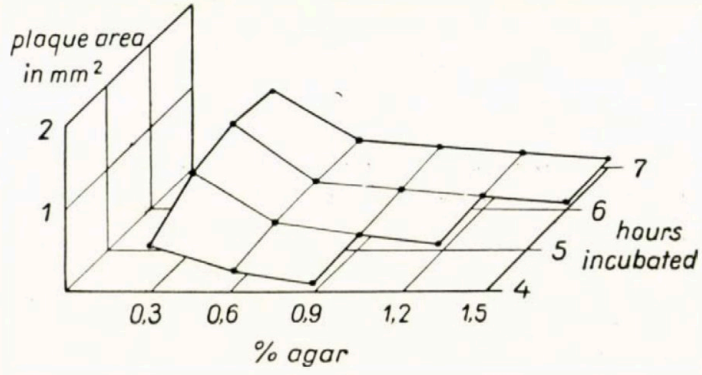


Fig. 11. Changes of phage area for phage »a«, at different agar concentrations

(v) *Temperature.* It is known that in the case of certain phages propagation at temperatures below 37°C results in higher phage counts than at 37°C [4]. Phage Sh. Fl. II. was cultured at 37°, 33° and 29°C, for periods of 4 to 7 hours, at different bacterial dilutions (Fig. 13).

The size of the plaque was smaller at lower temperatures than at higher ones, while the phage counts showed no difference at the three temperatures tested. It is not thought advisable to incubate at a low temperature, because this would require a prolonged period of incubation and, owing to the reduced rate of bacterial growth, it would be more difficult to count the phage plaques.

(vi) *Adsorption.* The relations of adsorption were studied with phage Sh. Fl. II. Most of the phage became adsorbed onto bacteria within the first few seconds already. In the experiment made with 12 parallels the mixed bacterium phage suspension was allowed to stand for 1, 2, 5, and 10 minutes in the cups of the titration plate and only then was the agar medium admixed. This was followed by a 5 hour period of incubation. The length of time allowed for adsorption did not influence the phage count.

Discussion

Our method eliminates the source of error which ensues from the adhering of semisolid agar medium onto the wall of the vessel. The method was applied successfully in the case of three different phages.

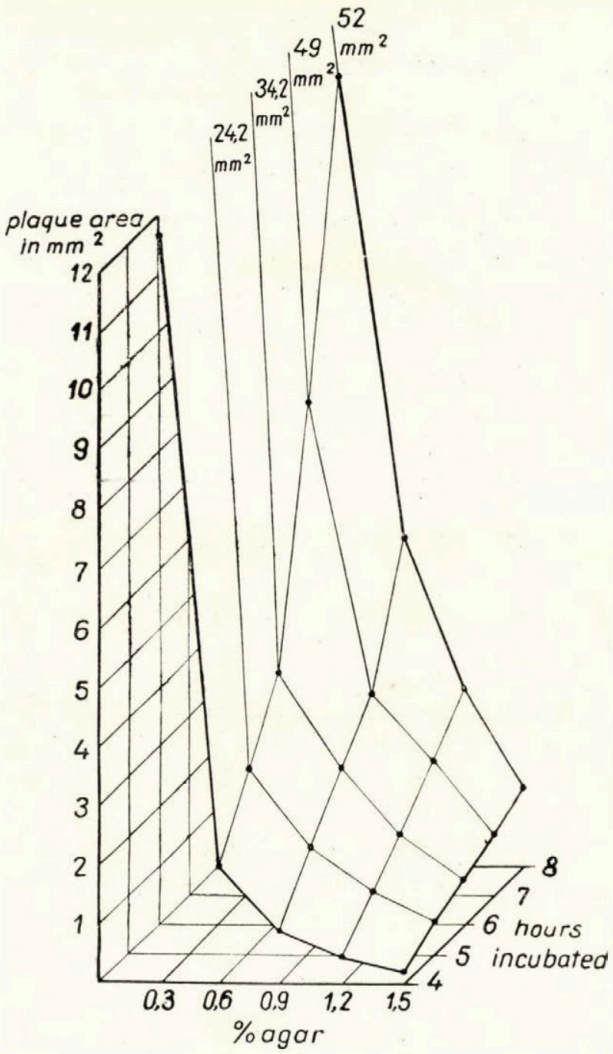


Fig. 12. Plaque area of phage »b« at different agar concentrations

If temperate phage is used, 2 ml of the medium containing 1 per cent agar must be poured into the cups. The bacterium/phage mixture made in a highly diluted agar medium is seeded on the surface of the agar plates.

The dilution and titration plates may be used without sterilisation, since a culture of indicator bacterium in the phase of logarithmic growth and of a high

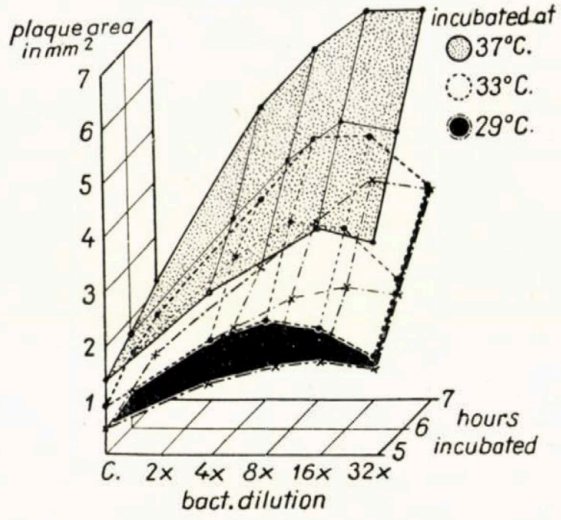


Fig. 13. Plaque area of Sh. Fl. II. phage, at different temperatures

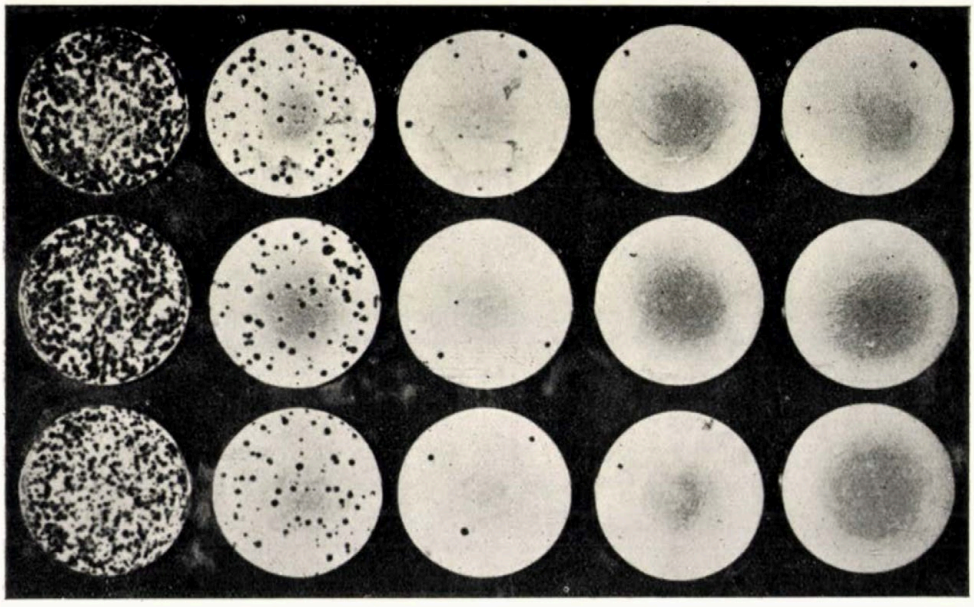


Fig. 14. Titration of actinophage with 3 parallels

concentration is used as inoculum. During the 5 to 8 hours of incubation the indicator bacterium and the phage plaques appear in the highest possible number

in the majority of cases, while air-borne bacteria, or those on the plate, can multiply at such a slow pace only that they do not interfere with the reading of titration results. The rapid multiplication of the indicator bacterium inhibits the growth of these bacteria. If, however, any kind of contamination by living organisms is to be excluded, the instruments used should be sterilized by exposure to ultraviolet light for 10 to 15 minutes and titration should be carried out in a sterile chamber.

It is worth to mention in connection with this the titration of the actinophage of a Streptomyces griseus strain, elaborated in co-operation with Zs. *Kőrösi*. It has been found that irrespective of the rather long period of incubation our method is suitable for the titration of this phage if sterile precautions are observed and the plates are provided with a metal lid during incubation (Fig. 14).

Of course, when perfect sterility is required, Petri dishes should be used.

The most favourable relations of titration for 3 phages are shown in Table III.

TABLE III

Optimum conditions required for making particle counts

Phage	Age of bacterial culture, hours	Number of living bacteria/ml	Agar conc. %	Incubation time hours
Sh. Flexneri II.	10—14	8.10^8	0,5	5
»a«	12—16	1.10^9	0,5	7
»b«	12—16	1.10^9	0,7	5

The variation coefficient of the results was computed from a high number of parallels. The highest variation coefficient $\pm 8{,}2\%$ was obtained with phage »a«, and the lowest, $\pm 3{,}48\%$ with phage Sh. Fl. II. In Table IV are shown the

TABLE IV

Comparison of variation coefficients of various phage titration methods

Horváth and Alföldi												Hershey et al.			Jones and Krueger		
phage																	
»a«				»b«				Sh. Fl. II.				P. C.			Staphylococcus		
Cup	Parallel	Phage count average	Var. coeff. %	Cup	Parallel	Phage count average	Var. coeff. %	Cup	Parallel	Phage count average	Var. coeff. %	Petri dish	Parallel	Var. coeff. %	Slide	Parallel	Var. coeff. %
150	3	120	±8,2	135	3	130	±7,3	90	3	100	±3,48	16	2	±13,0	16	2	±6,9
150	3	166	±6,53	130	3	130	±6,4	90	3	91	±4,05						
				105	3	129	±5,18										

variation coefficients of the phage titration methods recognized as most suitable in the literature, along with their other characteristics.

The precision of the method is well illustrated by the results of titrations made after storing standard phage suspensions for various lengths of time (Table V). The titre of phage »a« was considerably reduced as soon as in two weeks, while the titre of the other two phages showed no appreciable decrease after 4 and 3 weeks, respectively. These results could be reproduced in a number of experiments.

TABLE V

Titres of the same suspension of phage, as determined at different points of time

Phage					
»a«		»b«		Sh. Fl. II.	
1953	Particle/ml	1953	Particle/ml	1953	Particle/ml
III. 5	$1{,}45.10^9$	III. 5	$1{,}10.10^{10}$	IV. 7	$1{,}66.10^8$
III. 19	$3{,}46.10^8$	III. 7	$9{,}35.10^9$	IV. 18	$1{,}78.10^8$
IV. 2	$1{,}26.10^8$	III. 19	$9{,}60.10^9$	IV. 19	$1{,}60.10^8$
IV. 3	$1{,}29.10^8$	III. 25	$8{,}60.10^9$	IV. 21	$1{,}86.10^8$
		III. 28	$9{,}60.10^9$	IV. 27	$1{,}76.10^8$
		III. 28	$1{,}02.10^{10}$	IV. 28	$1{,}58.10^8$
		III. 30	$9{,}62.10^9$	IV. 28	$1{,}54.10^8$
		IV. 3	$9{,}68.10^9$		

The advantages of our method may be summarized in the following.

1. The dilutions of phage may be precisely measured into the cups, particularly so in cases where it is not necessary to measure the phage with a diluent containing agar.

2. The low coefficients of variation show that titration may be carried out with a high degree of accuracy.

3. Considerable amounts of medium may be saved.

4. The procedure is simple and rapid, since one worker by himself may carry out titration even in 100 cups within 2 to 3 hours, including the time required for preliminary work.

SUMMARY

A method of phage titration has been described. The most favourable conditions of titration have been established for three phages. The bacteriophage is diluted on a plexiglass tray, with the aid of *Takátsy*'s loop. Instead of Petri dishes, cups drilled into plexiglass titration plates are used. In the cups some phages are titrated without agar basis, while others are counted on an agar plate. After mixing the bacterial and phage suspensions with the medium in the cups the titration plates are incubated in a humid chamber placed in an incubator and the plaques grown are counted under a counter apparatus. The variation coefficient of the titration results, related to 3 different types of phage, varied between $\pm$ 3,48 and $\pm$ 8,2.

LITERATURE

1. *Фишер, М. Н.* и *Горелова, Е. А.*: Труды ленинградского санитарно-гигиенического медицинского института **5**. 30 (1950).
2. *Gratia, A.:* Ann. Inst. Past. **57**, 625 (1936).
3. *Hershey, A. D., Kalmanson, G.* and *Bronfenbrenner, J.:* J. Immunol. **46**, 267 (1943).
4. *Jones, D.* and *Krueger, A. P.:* J. gen. Phys. **34**, 347 (1951).
5. *Takátsy, Gy.:* Kísérletes Orvostudomány **2**, 393 (1950).
6. *Horváth, I.* and *Alföldi, L.:* Kísérletes Orvostudomány, (1954). In Press.

НОВЫЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ МЕТОД ТИТРОВАНИЯ ФАГА НА ПЛАСТИНКАХ ИЗ ПЛАСТМАССЫ

И. Хорват и Л. Алфёльди

Р е з ю м е

Описывается метод титрования фага. Подробно определяем оптимальные условия для трех различных фагов. Разведение бактериофага производим петлей Такачи на титровальных пластинках, изготовленных из плексиглаза. Вместо чашек Петри употребляем изготовленные из плексиглаза пластинки с выдолбленными чашечками. В этих чашечках имеется возможность титрования различных фагов, как с применением агара, так и без агара. После смешивания введенных в чашки бактерий, фага и агара, титровальные пластинки инкубируем в помещенных в термостат влажных камерах. Появляющиеся бляшки подсчитываем счетным аппаратом. У трех различных фагов был подсчитан вариационный коэффициент величиной от $\pm$ 3,48 до 8,2%.

A BACTERIAL DISEASE OF MILLET NEW FOR HUNGARY

By
Z. KLEMENT

Research Institute for Plant Protection, Budapest

Received November 19, 1953

In July, 1952, on some experimental plots of the Research Institute for Crop Production at Martonvásár, a disease of millet was observed, that until then had been unknown in Hungary. Certain characteristics of the symptoms indicated that the damage was caused by bacteria. We set ourselves the aim to get acquainted with the disease and to define its causative agent.

Survey of the pertaining literature

Two kinds of bacterial disease of millet are known in the literature. One was described for the first time by *Elliott* [2] in 1923 under the name of streaky bacteriosis of millet. It is caused by *Bacterium panici Elliott* [*Xanthomonas panici (Elliott) Savulescu* 1, 3]. It was later described in Wisconsin and South-Dakota (USA). In Bulgaria it was reported by *Kovachevsky* [6], but without an exact determination of the causative agent. *Naidenko* found it in 1940 in the Voroniezh district (USSR) on *Setaria glauca* as well as on millet. According to *Shevchenko* (1947), it spread with considerable rapidity in Western-Sibiria where the pathogen attacked *Echinochloa crus-galli* under plough-land conditions, causing severe damage. The bacteria kept alive on the remains of *Echinochloa crus-galli* and caused renewed infections next year. So far then the spread of *Xanthomonas panici* appears to be restricted to two states in the U. S. A., to the central regions of the Soviet Union, to Western-Sibiria, and presumably to Bulgaria. The other bacterium pathogenic for millet is *Pseudomonas panici-miliacei (Ikata and Yamauchi) Savulescu* [4], described in 1931, and observed in Japan. It causes streakiness of the millet leaves.

Material

The disease first manifested itself in the varieties »Polish Red« (Strzeliskie Cervone) and »Red of Saratov« (Saratovskoie 853), both imported for breeding purposes in the year 1951. From these it spread to other varieties in adjacent

plots. Particularly the strains of »Morocco Yellow« and »B. Friedrich Yellow« proved susceptible to the infection. The disease did not appear in the millet varieties »Omsk« (Omskoie 9) and »Kasan« (Kasanskoie 56), due probably to the early ripening of these varieties.

Symptoms

The pathogenic organism attacked leaves, stems and panicles (Fig. 1). Streaks, some broader some narrower, appeared on the attacked leaves parallel

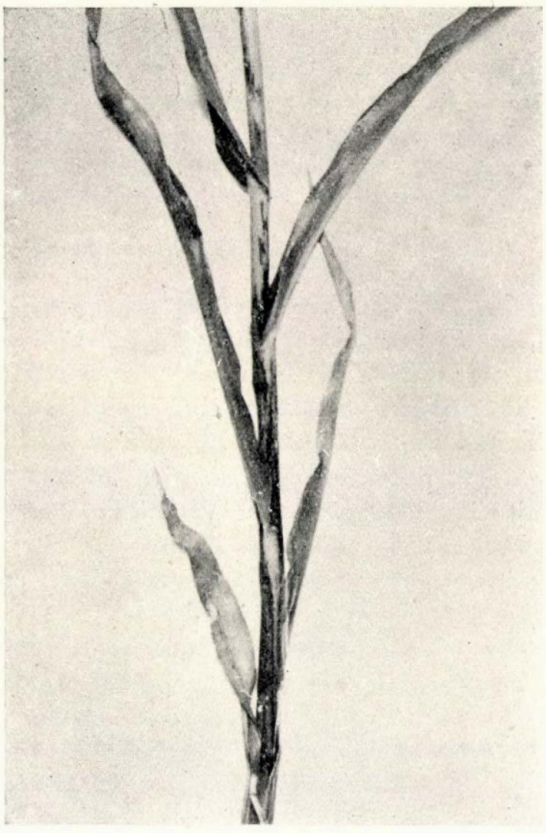


Fig. 1. Millet infected with Xanthomonas panici

to the venation, first diaphaneous, light-green, brownish, later — when withered — ochre-yellow. The bacterial spots on the blades continued downward in streaks on the stalk, of a darker, mostly brownish-red, or in some place a dirty olive-green colour. The streaks grew broader at the nodes. In general, the damage done was greater on the petioles (Fig. 2). The disease developed strongest

in the period before the sprouting of panicles. The grains of the panicles shooting up from between infected sheaths remained completely barren. It is symptomatic for the disease that, particularly under humid conditions, the attacked tissues exude bacterial ooze covering the coloured streaks like lacquer, especially

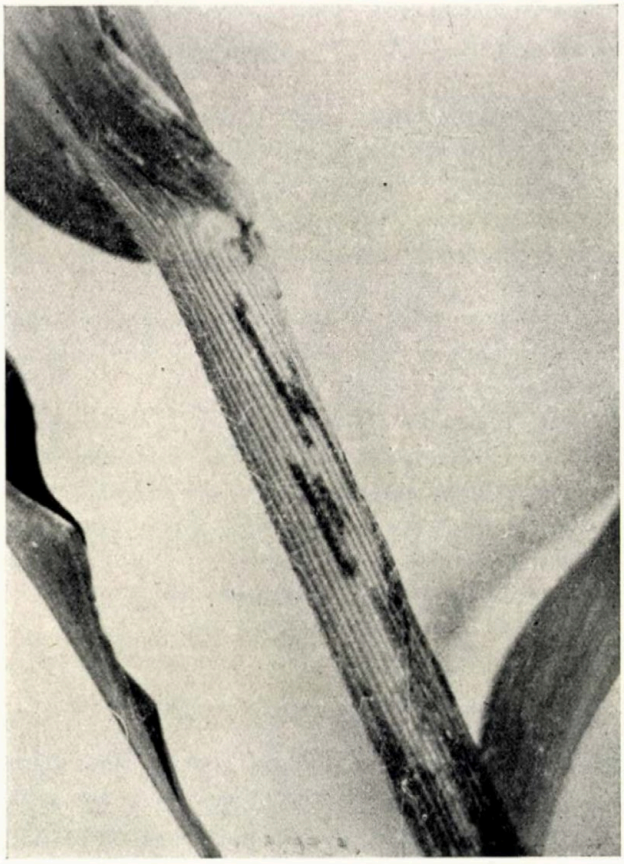


Fig. 2. Bacterial streaks on the stalks of millet

the necrotic spots on the leafstalks. Humidity was conducive to the spreading of the disease.

Isolation and determination of the pathogenic agent

A mash of infected tissues was spread on nutrient agar. Colonies of bacteria appeared after 24 hours. The colonies were fairly uniform, with a relatively small proportion of saprophytes. The (C 011) colony which gave positive results in artificial infections in the green-house was on the average 2 mm in diameter,

circular, slightly dirty-white, opaque and shiny. After some time the border of the colonies became slightly repand. Beef-bouillon clouding was moderate with a thin pellicle.

Under the microscope the rods appeared motile, moving single or in pairs, sometimes forming short chains. They were relatively easy to stain with the usual bacteriological dyes. They proved to be Gram negative, and also negative to Ziehl-Neelsen. Their size varied between $0{,}6 \times 1{,}5$ and $0{,}8 \times 1{,}8$ microns.

On potato blocks development was moderate, and the colonies presented an ochre-yellow colour, while the blocks became greyish-mauve. The colour of the colony changed after 15 days into a bright ochre-yellow.

On blood agar greyish-white colonies developed but relatively feebly. No haemolysis or haemopepsis could be observed in the nutrient medium. The bacterium did not liquefy gelatine.

Nitrite was produced after 3 days in pepton-water containing nitrate.

Feeble starch hydrolysis was observable on the fifth day. Indole was not formed even after twelve days.

In litmus milk, from the seventh day on, a reduction of litmus from bottom to surface, and a feeble peptonization, began to take place. Peptonization and reduction of litmus were completed after the seventeenth day.

Fermentation was tested on 14 kinds of sugar and sugar-like alcohols, viz. glucose, levulose, galactose, xylose, lactose, raffinose, saccharose, maltose, mannose, dextrine, inulin, mannitol, asparagin, and glycerine. No acid or gas was formed in either test tube after the 21st day.

Experiments in artificial infections

In order to demonstrate the primary role of the bacterium, artificial infections were performed, mainly in the green-house, the extraordinarily dry summer of that year being unfavourable to open-air experiments.

The millet plants were infected in the green-house during two different developmental stages: in the third week of development and immediately before the sprouting of the panicles. In both cases 50 plants of each the »Polish Red« and »Red of Saratov« varieties were infected. The daily mean temperature in the green-house was about 26° C.

In the first experiment three weeks old millet plants were sprayed with an aqueous suspension of the pure culture. On the seventh day, 82 per cent of the infected plants showed the typical symptoms of the disease. On the young millet plants ochre-yellow and olive-green, oedematous longitudinal streaks appeared. Generally, the plants were arrested in development, and 22 per cent of them toppled and withered off, showing symptoms of moist rotting at the butt of the stalk. A number of plants died off before the sprouting of panicles.

The plants that survived this stage seemingly bore fruits, but their grains were barren.

In the second experiment the plants were infected immediately before the sprouting of the panicles. A suspension of the bacteria in physiological saline was injected through a cannula under the sheaths covering the panicles, without injuring the plants. The symptoms of disease appeared on the second day, and were concordant with those detailed above. All the sprouting panicles attracted the disease, and in a number of plants the panicles did not even shoot.

In general, positive results were obtained, to a large extent, in both ways of experimental infection. A strong developmental retardation of the diseased plants was characteristic.

The symptoms in the artificially infected plants were identical with those observed in the field, the sole exception being that the streaks on the stalks were of a less dark colour. Reisolation of the original pathogenic agent from the diseased plant was in each case possible.

It can safely be stated that the agent isolated from the affected tissues of the millet was morphologically, physiologically, and biochemically wholly identical with *Xanthomonas panici (Ellliott) Savulescu*. Similarly both the symptomatic congruency and the results of the artificial infections confirmed the role played by *Xanthomonas panici*.

Quick identification of the pathogen by agglutination

The morphological characteristics of the bacterium and the peculiarities displayed by the colonies were found to be too restricted to permit of conclusions either on hand of microscopic examinations, or from the shape, colour, or any other quality of the colonies. On this account, serological agglutination was introduced for the purpose of mass examination.

Rabbits were immunized through the ear vein with increasing doses of a *Xanthomonas panici*-suspension equivalent to Brown's grade IV. The suspension was obtained by washing off a 36 hour agar culture with physiological saline of pH 7,0. Immunization of the animals was repeated every four days with increasing doses of the suspension (1, 2, 3, 4 ml). One week following the fourth immunization blood samples were taken and the rabbits were bled to death through the carotid artery. The immune serum obtained was preserved by adding 0,5 per cent carbolic acid. The titre was determined by an agglutination test. In order to accelerate the reaction the agglutination tubes were placed into a water bath of 37° C for two hours.

The immune serum, when brought together with a suspension of *Xanthomonas panici* in physiological saline, was found to agglutinate the bacteria up to a dilution of 1 to 20 480 (H agglutination). This proves, that with *Xantomonas panici* bacteria it is possible to produce an immune serum of high titre.

SUMMARY

For the first time a bacteriosis of millet has been observed in Central Europe, at Martonvásár (Hungary). The disease manifests itself in brownish streaks on the plants and ultimately causes their destruction and barren grains (Fig. 1, 2). By morphological, physiological, and biochemical tests the pathogenic agent has been identified as *Xanthomonas panici (Elliott) Savulescu*. The pathogenicity of the bacterium has been demonstrated by artificial infection. For quick and reliable identification of the organism a serological agglutination test has been employed.

LITERATURE

1. *Bergey*'s Manual of Determinative Bacteriology. 4. ed., 1948.
2. *Elliott, Ch. D.:* A bacterial stripe disease of Proso millet. Jours. Agr. Res. 1923, 26. p. 151.
3. *Elliott, Ch. D.:* Manual of bacterial plant pathogens. Chronica Botanica Co. Waltham, 2. ed., 1951.
4. *Ikata* et *Yamauchi:* Journ. Plant. Protect. **18**, 35 (1931).
5. *Izrailskij, V. P.:* Bacterial diseases of plants (Russian only) Selhozgiz, Moscow, 1952.
6. *Kovachevsky, I. C.:* Rev. Inst. Rech. Agron. Bulg. **8**, 3 (1938).

НОВОЕ БАКТЕРИАЛЬНОЕ ЗАБОЛЕВАНИЕ ПРОСА В ВЕНГРИИ

З. Клемент

Резюме

Полосатый бактериоз в Средней Европе впервые был обнаружен в Венгрии на мартонвашарской селекционной станции. Заболевание появилось в первую очередь на просе сортов Стржелецкие Червоне и Саратовское 853. Отсюда перешло на сорта соседних участков. Заболевание не проявлялось на просе Омское 9 и Казанское 56.

Возбудитель болезни причиняет бурую полосатость проса (рис. 1—2.), рыхлость семен и в конце концов приводит к гибели растения. Данные морфологических, физиологических и биохимических исследований упомянутой бактерии сходятся с данными тех же исследований описанной Эллиотом бактерии Xanthomonas panici, с тем отличием, что у первой не отмечалось медленного разжижения желатины. Патогенность данной бактерии нами доказана путем экспериментальных заражений. Заражения проводились в оранжереях, частью опрыскиванием взвесью бактерии, частью впрыскиванием взвеси под лиственное влагалище растений.

С целью более легкого распознавания возбудителя болезни применялся серологический метод агглютинации. Кролика иммунизировали введением в ушную вену постепенно повышаемой дозы (1, 2, 3, 4 мл.), с четырехдневными интервалами. Неделю спустя после последней, т. е. четвертой иммунизации произвели обескровливание животного и таким образом получили иммунную к Xanthomonas panici сыворотку в титре 1/20480.

ÜBER EINEN FALL VON TYPENÄNDERUNG DES VIRUS DER MAUL- UND KLAUENSEUCHE

Von
J. MÉSZÁROS

Institut für Seuchenlehre der Veterinärmedizinischen Hochschule in Budapest

Eingegangen am 19. Dezember 1953

Die altbekannte Erfahrung, wonach von der Maul- und Klauenseuche genesene Rinder wiederholt von dieser Krankheit ergriffen werden können, erhielt eine derzeit allenthalben anerkannte Erklärung, als *Vallée* und *Carré* (1922) den Nachweis dafür erbracht hatten, dass das Virus der Maul- und Klauenseuche nicht einheitlicher Natur ist, sondern in immunbiologischer Hinsicht in verschiedene Typen zerfällt. Sie konnten zunächst zwei Typen (O und A) unterscheiden, und später zeigten *Waldmann* und seine Mitarbeiter (1926), dass noch ein dritter Typus (C) vorkommt. In neuerer Zeit sind dann innerhalb dieser Typen noch mehr oder weniger voneinander abweichende Varianten, so innerhalb des Typus A mindestens fünf, festgestellt worden.

Alsbald nach der Feststellung des Vorkommens verschiedener Virustypen tauchte die Frage auf, ob diese Typen ihre immunbiologischen Eigenschaften dauernd festhalten oder sich ineinander verwandeln können. *Manninger* und *László* gelang es wohl schon 1930 auf Grund von Erfahrungen, die sie in Meerschweinchenversuchen gemacht hatten, den Beweis dafür zu erbringen, dass eine Typenumwandlung selbst bei Virusstämmen möglich ist, die an Meerschweinchen angepasst sind, doch erst später wurde die Veränderlichkeit des Virus der Maul- und Klauenseuche hauptsächlich auf Grund von praktischen epizootologischen Erfahrungen anerkannt. Immerhin schien die Auffassung nicht vollauf durchdringen zu wollen, dass eine Typenumwandlung auch im Meerschweinchenkörper möglich sei. Dass aber eine solche doch möglich ist, haben auch die Versuche von *Daubney* (1934) sowie von *Eccles*, *Longley* und *Thomson* (1937) nahegelegt, und neuerdings haben *Kindjakow*, *Bajadinow*, *Philipowitsch* und *Nikanowa* (1952) erneut den Beweis dafür erbracht, dass selbst an Meerschweinchen angepasste Virusstämme ihren Typus verändern können.

Einen weiteren Beweis für die Richtigkeit dieser Auffassung gelang es uns erst kürzlich wieder zu erbringen. Wir glauben annehmen zu können, dass die Mitteilung der diesbezüglichen Versuche einiges Interesse haben dürfte.

In unserem Institut laufen in einem besonders eingerichteten Laboratorium schon seit Jahrzehnten Versuche mit dem Virus der Maul- und Klauenseuche ausschliesslich an Meerschweinchen. Es standen uns hierzu drei alte Virus-

stämme (je ein O-, A- und C-Stamm) zur Verfügung. Im Mai 1952 erhielten wir durch die Liebenswürdigkeit der Forschungsanstalt für Tierseuchen aus Riems drei weitere Virusstämme (je einen O-, A_5- und C-Stamm). Sie wurden bei uns ebenfalls in Meerschweinchenpassagen weitergeführt. Von Zeit zu Zeit pflegen wir unsere Stämme auf ihre Typenreinheit zu kontrollieren. Als wir nun den aus Riems erhaltenen O-Stamm aus der 42. Meerschweinchenpassage untersuchten und namentlich im Komplementbindungsversuch den Extrakt der Sohlenblasenwand dieser Passage als Antigen verwendeten, zeigte es sich, dass eine Bindung des Komplements nicht mit dem O-Immunserum, sondern bloss mit dem A_5-Serum zustande gekommen ist (Tabelle I). Demnach ist an diesem O-Stamm eine Typenumwandlung erfolgt.

TABELLE I

In dieser und in den folgenden Tabellen wird mit Kreuzen der Grad der Komplementbindung bezeichnet

Immunserum	Antigen	Komplementeinheiten			
		4	3	2	1
O	O_{42}	—	—	—	—
A_5		+++	++++	++++	++++
C		—	—	—	—

Gleichsinnig verlief auch der Kreuzimmunisierungsversuch (Tabelle II).

TABELLE II

Meerschweinchen immunisiert gegen Stamm	Reinfektion mit Passagevirus O_{42}	
	Primäre	Sekundäre
	Blasen nach ... Stunden	
O	24	48
O	24	—
A_5	24	—
A_5	—	—
C	24	48
C	24	48

Bei weiteren Passagen hielt der Stamm unverändert die Eigenschaften des Typus A_5 bei. (Wir wollen den Stamm unbeschadet dieser Tatsache auch weiterhin als Stamm 0 bezeichnen mit Beifügung der Zahl der durchgemachten Passagen im Meerschweinchenkörper.)

Zur Entscheidung der Frage, bei welcher Passage die Typenänderung stattgefunden hatte, wurden zwei Versuche angestellt. In dem einen Versuch infizierten

wir die Sohle jener Meerschweinchen, die nach vorherigen Passagen mit dem fraglichen O-Stamm am Leben geblieben sind, mit dem Virus aus der 45. Passage, somit mit dem Virus, das bereits die Merkmale des Typus A_5 aufgewiesen hatte (Tabelle III).

TABELLE III

Meerschweinchen genesen von der Ansteckung mit Virus der ... Passage	Reinfektion mit Passegevirus O_{45}	
	Primäre	Sekundäre
	Blasen nach ... Stunden	
14.	24	48
22	24	48
25.	24	48
28.	24	48
31.	24	48
35.	24	48
37.	24	48
38.	24	48
39.	24	72
39.	24	—
41.	—	—
42.	—	—
43.	—	—
Kontrolltier	24	48
«	24	48

Es zeigte sich, dass der Stamm bis zur 38. Passage seine ursprünglichen Eigenschaften beibehalten hat, denn die durchseuchten Meerschweinchen erkrankten bis zur 38. Passage ebenso wie die Kontrolltiere. Anders verhielten sich die Meerschweinchen der 39. Passage, denn sie erwiesen sich als teilweise immun, und vollauf widerstanden die Meerschweinchen der 41.—43. Passagen. Die Umwandlung musste demnach zwischen der 38. und der 41. Passage stattgefunden haben.

In dem anderen Versuch prüften wir die Seren von Meerschweinchen aus verschiedenen Passagen des fraglichen Stammes mit der Komplementbindungsprobe, wobei in Parallelversuchen als Antigene Auszüge aus Blasendecken von Meerschweinchen zur Verwendung kamen, die intraplantar mit Virus der 30. bzw. 45. Passage des fraglichen Stammes (O_{30} bzw. O_{45}) bzw. mit dem Virus der 52. Passage des originären A_5-Stammes infiziert worden waren (Tabelle IV). Der Versuch verlief gleichsinnig mit dem Versuch der Tabelle III. Es ist hier klar ersichtlich, dass im Serum von Meerschweinchen der 39. und 40. Passagen

TABELLE IV

Serum von Mschw., die von der Ansteckung mit der... Passage des O-Stammes genesen sind	Antigen O_{30}				Antigen O_{45}				Antigen A_9			
	Komplementeinheiten											
	4	3	2	1	4	3	2	1	4	3	2	1
30.	++++	++++	++++	++++	−	−	−	−	−	−	−	−
37.	++++	++++	++++	++++	−	−	−	++	:	:	:	:
38.	++++	++++	++++	++++	−	−	+	+++	:	:	:	:
38.	++++	++++	++++	++++	−	−	+	++	:	:	:	:
38.	−	−	+	+++	−	−	−	−	−	−	−	+
38.	−	−	+	++	−	−	−	−	−	−	−	+
39.	+++	++++	++++	++++	−	−	++	+++	:	:	:	:
39.	++	+++	++++	++++	+	+++	++++	++++	−	+	+++	++++
39.	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+	+++	++++	++++
39.	++	++	++++	++++	++	+++	++++	++++	+	++	++++	++++
39.	−	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	+++	++++	++++
39.	−	−	+	+	+++	++++	++++	++++	−	+	++	+++
39.	−	−	−	−	−	+	++	+++	−	−	++	+++
40.	−	−	++	+++	++++	++++	++++	++++	++	+++	++++	++++
40.	−	−	−	++	++++	++++	++++	++++	++	+++	++++	++++
40.	−	−	−	−	+	++	++++	++++	−	+	+++	++++
40.	−	−	−	−	−	−	−	++	−	−	−	+
41.	−	−	−	−	−	++	++++	++++	−	++	++++	++++
42.	−	−	−	+	++	+++	++++	++++	:	:	:	:
43.	−	−	−	+	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
45.	−	−	−	−	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

TABELLE V

Meerschweinchen genesen von der Ansteckung mit Virus der ... Passage	Immunserum O				Immunserum A_3				Immunserum C			
	Komplementeinheiten											
	4	3	2	1	4	3	2	1	4	3	2	1
34.	++++	++++	++++	++++	−	−	−	+	−	−	−	−
35.	++++	++++	++++	++++	−	−	−	+	−	−	−	−
36.	++++	++++	++++	++++	−	−	−	+	−	−	−	−
37.	+++	++++	++++	++++	−	−	−	−	−	−	−	−
38.	++	+++	++++	++++	−	−	−	−	−	−	−	−
39.	++++	++++	++++	++++	+	++	+++	++++	−	−	−	+
40.	−	−	+	+++	++++	++++	++++	++++	−	−	−	+
41.	−	−	−	+	++++	++++	++++	++++	−	−	−	−
42.	−	−	−	+	++++	++++	++++	++++	−	−	−	−

Antikörper sowohl gegenüber dem originären O- wie gegenüber dem originären A_5-Stamm enthalten waren, während das Serum der Tiere der früheren Passagen Antikörper bloss gegenüber dem originären O-Stamm und das Serum der nachfolgenden Passagen Antikörper bloss gegenüber dem 45. Passagestamm und dem originären A_5-Stamm beherbergte.

Wichtig scheint uns bei diesem Versuch die Feststellung, dass nach der Typenumwandlung die Typenauslese nicht schlagartig erfolgt, wie man das angesichts der Kreuzimmunisierungsversuche voraussetzen könnte, sondern erst allmählich auf die Weise vonstatten geht, dass während zwei Passagen im Tierkörper neben dem Virus des neuentstandenen Typus auch Virus des originären Typus zugegen ist.

Nach Klarstellung der mitgeteilten Verhältnisse griffen wir zum Virus der 32. Passage des O-Stammes aus Riems zurück und führten damit weitere Passagen durch. Diesmal bereiteten wir jedoch aus der Sohlenblasenwand der Meerschweinchen sämtlicher Passagen Auszüge und untersuchten diese im Komplementbindungsversuch auf die Typenzugehörigkeit der in ihnen enthaltenen Antigene. Wie aus Tabelle V ersichtlich, enthielten die Auszüge bis einschliesslich der 38. Passage bloss Virus vom O-Typus. Dagegen liessen sich, in Übereinstimmung mit den bereits mitgeteilten Erfahrungen, in den Auszügen der 39. und 40. Passagen nebeneinander die Antigene sowohl des originären O-Typus wie auch des neuaufgetretenen A_5-Typus nachweisen, während die Auszüge von der 40. Passage an wieder bloss Virus vom Typus A_5 enthielten.

Dieser Versuch wurde noch dreimal wiederholt, wobei zweimal dasselbe Ergebnis erhalten wurde, in dem dritten Versuch jedoch bis zur 43. keine Typenänderung eingetreten ist.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Versuche bestätigen die von *Manninger* und *László* bereits 1930 mitgeteilte Erfahrung, wonach auch an Meerschweinchen angepasste Stämme des Virus der Maul- und Klauenseche aus vorläufig unbekannten Gründen ihre Typenzugehörigkeit ändern können. Dabei erfolgt jedoch die Auslese des neuentstandenen Typus nicht schlagartig, denn es liess sich während zwei Passagen im Meerschweinchenkörper neben dem neuentstandenen Typus auch Virus des originären Typus nachweisen.

LITERATUR

Daubney: Jour. Comp. Path. **47**, 259 (1934).
Eccles, Longley und *Thomson:* Jour. Comp. Path. **50**, 412 (1937).
Кындяков, Баядинов, Филипович и Никанова: Ветеринария **8**, 21 (1952).
Manninger: Bull. Office Intern. des Épizooties **5**, 1 (1931).
Manninger und *László:* Bull. Office Intern. des Épizooties **3** 402 (1930). Zentralbl. Bakt. I. Orig. **116**, 414 (1930).

ИЗМЕНЕНИЕ ТИПА ВИРУСА РЫЛЬНОКОПЫТНОЙ БОЛЕЗНИ

Й. Месарош

Р е з ю м е

Маннингер и Ласло уже в 1930 году установили, что тип вируса рыльнокопытной болезни может изменяться и при пассажах на морских свинках. Однако некоторые авторы сомневались в возможности изменения типа вируса, адаптированного к организму морских свинок. Описанные в данной статье опыты не только подтвердили эту возможность, но и показали, что после изменения новый тип не селектируется сразу. Оказалось, что после двух пассажей у морских свинок — наряду с новообразованным типом — имеется наличие также и старого типа вируса.

THE ROLE OF A BLASTOMYCES SPECIES IN THE GENESIS OF INTERSTITIAL PNEUMONIA OF THE PREMATURE INFANT

A PRELIMINARY REPORT

By
A. CSILLAG and L. BRANDSTEIN

State Institute for Public Health and Municipal László Hospital, Budapest

Received February 6, 1954

The clinical and pathological aspects of the interstitial plasmocytic pneumonia of premature infants has been clarified [1, 2, 3, 4]. On the other hand, opinions vary as to the pathogenic agent responsible for the condition. *Jirovec* et al suggested a protozoon named *Pneumocystis carinii* [5, 6, 7], while *Giese* [8] attributed the pathogenic role to *Saccharomyces octosporus* that he had isolated from the lung in 5 lethal cases of interstitial pneumonia. He has, however, failed to induce the disease experimentally, nor could he produce *in vitro* the »sporogonial forms« characteristic of it.

The investigations to be reported in the present paper were started in August, 1953. We have accepted the view of *Giese* [8] and, along with *Zoltai* [9], gave the parasite theory the benefit of doubt.

Part of the results have been published in November, 1953, [10], and made known also in a lecture delivered at the Hungarian Congress of Paediatrics [11] in November, 1953. It has been revealed that in a number of cases of fatal interstitial pneumonia pure cultures of a certain yeast could be recovered from the section material, while the controls were negative. On a sporulation medium the fungus forms asci containing 1—2—4—8 ascospores, which have been suggested by *Jirovec* to be identical with the sporogonia of Pneumocystis carinii. In the lecture mentioned, results of successful animal experiments have also been presented. Section material from animals with experimentally induced interstitial pneumonia yielded pure cultures of the fungus and the histological picture showed the »foamy material« characteristic of the disease.

One month after the publication of our results, *Simon* [12] reported that thrush could be isolated from the lungs of subjects succumbed to interstitial pneumonia, and published the results of successful animal experiments on the basis of which the so-called sprogonial form is said to be an unusual variant of thrush. *Simon*, however, failed to publish histological pictures to support his view.

In the following, results of morphological and biological examinations aimed at identifying the fungus, as well as the results of animal experiments will be presented.

The fungus belongs to the Saccharomyceteae tribe of the order »Endomycetales«. It is closely related to thrush, (Candida albicans), the fungus considered by *Simon* as the pathogenic agent. When propagated under identical conditions, the two fungi show a marked morphological similarity, but on corn meal agar Candida albicans produces characteristic chlamydospores, and on Sabouraud's agar, at room temperature, hyphae are formed within 6 days. The same happens on inoculation into a gelatine medium. In the case of Saccharomyceteae the above structures characteristic of Candidae do not appear, multiplication being of the blastospore type. All three tests showed that the fungus isolated by us was not identical with Candida albicans, provided that the latter fungus keeps the mentioned properties under all conditions and provided that in its properties variations to the above effect do not occur. The difference between the fermentative properties of the two fungi makes such an assumption improbable.

In the experiments 28 newborn mice were used. 12 of them were made to inhale a suspension of the fungus. 12 of these animals were also given daily 4000 U of penicillin subcutaneously. The rest, 4 mice, were made to inhale a suspension of killed fungi. The majority of the animals, especially those treated with penicillin, succumbed within 4 weeks ; the survivors were killed at the age of 4 weeks by stunning. At autopsy, gross examination of the spontaneously died animals showed pneumonia, while histology revealed changes similar to those caused by interstitial pneumonia, with the typical »foamy« substance demonstrable in the alveoli. Lung smears stained according to Giemsa showed a number of blastomyces and asci similar to the so-called »sporogonial forms«. The fungus could be recovered in pure culture from each of the lungs. The control animals gave negative results in every respect.

The report by *Simon* apparently confirms our earlier suggestion that the pathogenic agent would be a yeast-like fungus. The only question remaining to be discussed seems to be the decision of the group to which the fungus belongs. Since both *Simon* and we succeeded in inducing the disease in animal experiments, it seems reasonable to examine whether the condition under discussion might not be caused by several, closely related fungi of the blastomyces type.

In order to elucidate this point, attempts are being made at inducing interstitial pneumonia in newborn animals by aspirating Candida albicans, as well as other yeasts. This appears the more justified, as workers in this country have frequently observed the presence of various yeasts and yeast-like fungi in the lungs in fatal cases of interstitial pneumonia.

Since our preliminary report has been submitted for publication evidence has been obtained showing that the aspiration of *Candida albicans* by mice results in the development of the well-known condition of pulmonary mycosis (moniliasis) ; this condition bears no resemblance whatsoever to insterstitial pneumonia.

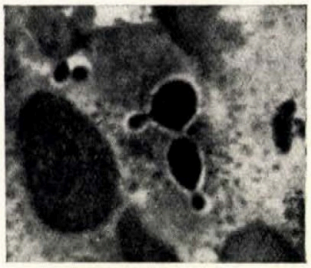


Fig. 1. Blastomyces in the lung smear from an infant with interstitial pneumonia

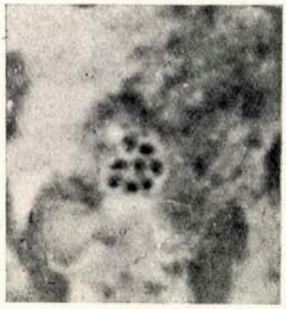


Fig. 2. Ascus in the lung smear of an infant with interstitial pneumonia

Fig. 3. Asci on sporulation medium

Fig. 4. Ascus in the lung smear from an experimental mouse

Fig. 5. 48-hour culture of the fungus (vital staining)

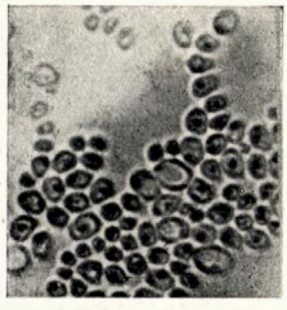


Fig. 6. 5-day micro-culture of the fungus. Corn meal agar

Fig. 7. 5-day microculture of Candida albicans. Corn meal agar

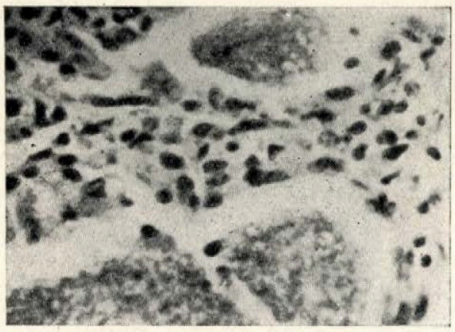


Fig. 8. Histological appearance of the lung from an infant succumbed to interstitial pneumonia

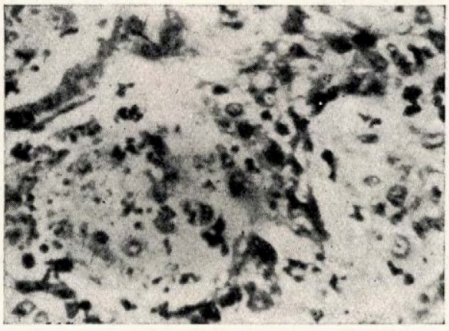


Fig. 9. Histological appearance of the lung from a mouse with experimentally induced interstitial pneumonia

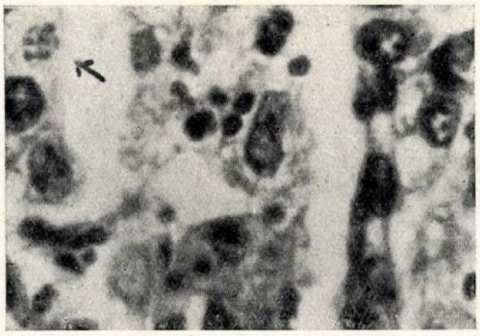


Fig. 10. Histological appearance of the lung from a mouse with experimentally induced interstitial pneumonia. The arrow points to an ascus in an alveolus

Also, we have failed in our attempts at inducing interstitial pneumonia by *Saccharomyces cerevisiae* aspiration.

Thus, it was only the fungus propagated by us that was capable of inducing a pathological condition similar to the interstitial pneumonia of man.

LITERATURE

1. *Waltner, K., Diósszilágyi, G., Páldy, L., Török, J., Molnár, L.:* Orvosi Hetilap, 955 (1953).
2. *Baló, J., Sculler, D.:* Orvosi Hetilap 966 (1953).
3. *Korpássy, B., Tiboldi, T., Török, J.:* Orvosi Hetilap 970 (1953).
4. *Kapus, Gy.:* Gyermekgyógyászat **3.**, 1 (1952).
5. *Vanek, J., Jirovec, O., Lukes, J.:* Ztrbl. f. Bakt. **158.** 120 (1952).
6. *Vanek, J., Jirovec, O., Lukes, J.:* Ann. Paed. **180.** 1 (1953).
7. *Dvorak, A., Jirovec, O.:* ibid. **42.** 222 (1953).
8. *Giese, H.:* Zschr. Kinderh. **101.** 147 (1953).
9. *Zoltai, N.:* Personal Communication.
10. *Csillag, A., Brandstein, L., Faber, V., Maczó, J.:* Orvosi Hetilap 1303 (1953).
11. Hungarian Congress of Paediatrics, Budapest, November 19, 1953.
12. *Simon, H.:* Die Naturwissenschaften, Issue 40 (1953).

INDEX

Csillag, A.: Weitere Versuchsangaben über das Antibiotikum »Granegillin« — Чиллаг, А.: Новые экспериментальные данные об антибиотике »Гранегиллин« 321

Vajda, Gy., Goreczky, L., Roth, I. und *Sümegi, S.:* Über die zytotropische Wirkung auf Tumorzellen — Вайда, Дь., Горецки, Л., Рот, И. и Шюмеги, И.: Цитотропное действие на опухолевые клетки 331

Surján, M., Richter, P. and *Réthy, L.:* Purification of Diphtheria and Tetanus Toxoids by Trichloracetic Acid I and II — Шурьян, М., Рихтер, П. и Рети, Л.: Очистка дифтерийного и столбнячного анатоксина трихлоруксусной кислотой. Сообщ. I. и II..... 339

Vajda, Gy. und *Backhausz, R.:* Wertmessung agglutinierender Immunsera mit der Filtrierpapiermethode — Вайда, Дь. и Бакхаус, Р.: Оценка агглютинирующих иммунных сывороток способом фильтровальной бумаги 349

Keszty üs, L., Szilágyi, T. und *Gyulai, F.:* Nervensystem und Immunität I. Wirkung von Barbiturat-Dauerschlaf auf den Immunkörpertiter des Blutes — Кестьюш, Л., Силадьи, Т. и Дьюлаи, Ф.: Нервная система и иммунитет. Сообщение I. Влияние барбитуратного сна на титр антител крови 359

Keszty üs, L., Szalay, S., Kocsár, L., Kertész, L. und *Salánki, J.:* Nervensystem und Immunität II. Können sich unter sekundenlanger Einwirkung von Antigenreizen spezifische Abwehrstoffe bilden? — Кестюш, Л., Салаи, Ш., Кочар, Л., Кертес, Л. и Шаланки, Я.: Нервная система и иммунитет. Сообщение II. Могут ли образовываться специфические антитела при нескольксекундном действии антигенного раздражения?..... 371

Backhausz, R. and *Neubauer, G.:* Studies in Haemolytic Disease of the Newborn — Бакхаус, Р. и Нейбауер, Дь.: Серологический диагноз гемолитических заболеваний новорожденных 377

Hussel, L. Über den Erreger der Knochenaktinomykose des Rindes — Хуссел, Л.: Возбудители актиномикоза костей рогатого скота 391

Ábrahám, E., Koch, A. and *Ivánovics, G.:* On the Cyclic Multiplication of the Aujeszky's Disease Virus — Абрахам, Э., Кох, А. и Иванович, Дь.: Циклическое размножение вируса болезни Ауеского..... 423

Nógrády, G. and *Rodler, M.:* A Double Layered Polytropic Medium in the Diagnostics of Enteric Bacteria — Ногради, Дь. и Родлер, М.: Двухслойная политропная питательная среда в диагностике кишечных бактерий 437

Fekete, L.: Die Wirkung diätischer Eiweisskomplettierung auf die Antitoxinproduktion bei mit Tetanusanatoxin immunisierten Kindern — Фекете, Л.: Влияние укомплектования системы питания белками на образование антитоксина у детей, иммунизированных столбнячным анатоксином 445

Darányi, Gy.: Untersuchungen über die Verbreitung der pathogenen Staphylokokken — Дараньи, Дь.: Исследования о распространенности патогенных стафилококков 453

Váczi L. und *Mihályfi, I.:* Über die gegen Corynebakterien antagonistischen Staphylococcus pyogenes-Stämme — Ваци, Л. и Михальфи, И.: Местонахождение и свойства штаммов Staphylococcus pyogenes, обладающих антагонистическими свойствами по отношению к бактериям группы Coryne 459

Farkas, E. and *Dömök, I.:* Aetiology of the 1953 Influenza Epidemic in Hungary — Фаркаш, Э. и Дэмэк, И.: Этиология эпидемии гриппа 1953 года в Венгрии 471

Horváth, S.: A New Sensitive Method of the Rolling Drum Type for Influenza Virus Titration — Хорват, И.: Новый чувствительный метод титрования гриппозного вируса в поворотном барабане 481

Horváth, S. and *Alföldi, L.:* A New and Sensitive Method of Phage Titration on Plastic Trays — Хорват, И. и Алфэльди, Л.: Новый чувствительный метод титрования фага на пластинках из пластмассы 495

Klement, Z.: A Bacterial Disease of Millet New for Hungary — Клемент, З.: Новое бактериальное заболевание проса в Венгрии 511

Mészáros, J.: Über einen Fall von Typenänderung des Virus der Maul- und Klauenseuche — Месарош, Й.: Изменение типа вируса рыльнокопытной болезни 517

Csillag, A. and *Brandstein, L.:* The Role of a Blastomyces Species in the Genesis of Interstitial Pneumonia of the Premature Infant — A preliminary report 525

A kiadásért felel: Mestyán János — Műszaki felelős: Farkas Sándor

A kézirat beérkezett: 1954. II. 26. — Terjedelem: 18½ (A/5) ív, 64 ábra

Akadémiai nyomda, Gerlóczy-u. 2. — 30244/54. — Felelős vezető: ifj. Puskás Ferenc

Les Acta Microbiologica paraissent en russe, français, anglais et allemand et publient des travaux du domaine de microbiologie.

Les Acta Microbiologica sont publiés sous forme de fascicules qui seront réunis en un volume.

On est prié d'envoyer les manuscrits destinés à la rédaction, et écrits à la machine, à l'adresse suivante :

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

Toute correspondance avec la rédaction doit être envoyée à cette même adresse.

Le prix de l'abonnement est de 110 forints ($ 6,50) par volume.

On peut s'abonner à l'Entreprise pour le Commerce Extérieur de Livres et Journaux «Kultúra» (Budapest, VI., Sztálin-út 21. Compte-courant No. 43-790-057-181) ou à l'étranger chez tous les représentants ou dépositaires.

The Acta Microbiologica publish papers on microbiological subjects in Russian, French, English and German.

The Acta Microbiologica appear in parts of varying size, making up one volume.

Manuscripts should be typed and addressed to

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

Correspondence with the editors should be sent to the same address.

The rate of subscription to the Acta Microbiologica is 110 forints ($ 6,50) a volume. Orders may be placed with »Kultúra« Foreign Trade Company for Books and Newspapers Budapest, VI., Sztálin-út 21. Account No. 43-790-057-181) or with representatives abroad.

Die Acta Microbiologica veröffentlichen Abhandlungen aus dem Bereiche der Mikrobiologie in russischer, französischer, englischer und deutscher Sprache.

Die Acta Microbiologica erscheinen in Heften wechselnden Umfanges. Mehrere Hefte bilden einen Band.

Die zur Veröffentlichung bestimmten Manuskripte sind, mit Maschine geschrieben, an folgende Adresse zu senden :

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

An die gleiche Anschrift ist auch jede für die Redaktion bestimmte Korrespondenz zu richten.

Abonnementspreis pro Band 110 Forint ($ 6,50). Bestellbar bei dem Buch- und Zeitungs-Aussenhandels-Unternehmen »Kultúra« (Budapest, VI., Sztálin-út 21. Bankkonto Nr. 43-790-057-50-181) oder bei seinen Auslandsvertretungen und Kommissionären.

54,— Ft